

**Produktion und Evaluierung von**  
***Ligand Sneaking*-Antikörperperfusionsproteinen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Bernd Voedisch

aus Sorengo di Lugano / Schweiz

|                                     |                                |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Referent:                        | Professor Dr. Stefan Dübel     |
| 2. Referent:                        | apl. Professor Dr. Jürgen Bode |
| eingereicht am:                     | 29.08.2008                     |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 21.11.2008                     |

Druckjahr 2008

Meinen Eltern gewidmet

---

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, und für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Ralf Mendel danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich danke Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann herzlich für die Betreuung im Labor und die Diskussion meiner Ergebnisse. Dr. Thomas Jostock danke ich herzlich für die pragmatische Einführung in die Thematik. Allen dreien danke ich herzlich für die Korrektur dieser Arbeit.

Doris Meier und Nina Strebe danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und die Hilfe bei den durchflusszytometrischen Messungen.

Wolfgang Graßl danke ich für die Hilfestellung bei den Arbeiten an den Bioreaktoren.

Saskia Helmsing danke ich für die Durchführung der Isolation von anti-CD71 scFv-Klonen aus der Phagendisplay-Genbibliothek HAL4.

Meinen beiden Diplomanden Jutta Maxi Jähnichen und Johannes Wichter danke ich für die engagierte und erfolgreiche Unterstützung bei den Experimenten.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Biotechnologie an der TU Braunschweig gilt mein herzlicher Dank für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Dr. Joop van den Heuvel und Daniela Gebauer (HZI, Braunschweig) danke ich für die Einweisung und Hilfestellung bei der Arbeit mit Insektenzellen.

Dr. Reinhard Voll und Dr. Bettina Sehnert (Universitätsklinikum Erlangen) danke ich für die Bereitstellung des zellbasierten NF-kappaB-Reporterassays und die Betreuung bei seiner Anwendung.

PD Dr. Robert Hänsch (Inst. f. Pflanzenbiologie, TU Braunschweig) danke ich für die Betreuung am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop.

Dr. Tim McGraw (Weill Medical College of Cornell University, New York City, NY, USA) danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien CHO TRVb und CHO TRVb-1.

Dr. Michaela Arndt (Universitätsklinikum Essen) danke ich für die Bereitstellung von MUC1-positiven Zelllinien.

Dr. Yoichi Kurokawa (Fukui Prefectural University, Fukui, Japan) danke ich für die Bereitstellung von Hilfsplasmiden zur Koexpression periplasmatischer Chaperone.

Mein tiefer, persönlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und besonders meiner Verlobten Sabrina für ihre ständige Unterstützung, Motivation und ihren Beistand.

# Verzeichnisse

## Inhaltsverzeichnis

|  |               |
|--|---------------|
| Inhaltsverzeichnis .....   | I             |
| Abbildungsverzeichnis .....  | V             |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | VII           |
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>- 1 -</b>  |
| 1.1 Antikörper und rekombinante Antikörperformate .....            | - 1 -         |
| 1.2 Biopharmazeutika und Antikörper-basierte Therapieansätze ..... | - 4 -         |
| 1.3 Das <i>Ligand Sneaking</i> -Konzept .....                      | - 6 -         |
| 1.3.1 Internalisierung durch den humanen Transferrinrezeptor ..... | - 8 -         |
| 1.3.2 Das <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A .....                      | - 9 -         |
| 1.3.3 Der Transkriptionsfaktor NF-kappaB .....                     | - 11 -        |
| 1.4 Sekretion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....                | - 18 -        |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....                                | - 19 -        |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                               | <b>- 21 -</b> |
| 2.1 Material .....   | - 21 -        |
| 2.1.1 Verbrauchsmaterial .....                                     | - 21 -        |
| 2.1.2 Laborausstattung .....                                       | - 21 -        |
| 2.1.3 Chromatographie-Matrices und -Säulen .....                   | - 23 -        |
| 2.1.4 Bakterienstämme .....  | - 23 -        |
| 2.1.5 Medien zur Kultivierung von Bakterien .....                  | - 24 -        |
| 2.1.6 Bakteriophagen .....   | - 25 -        |
| 2.1.7 Insektenzellen .....   | - 25 -        |
| 2.1.8 Medien zur Kultivierung von Insektenzellen .....             | - 26 -        |
| 2.1.9 Mammalia-Zelllinien .....                                    | - 26 -        |
| 2.1.10 Medien zur Kultivierung von Mammalia-Zellen .....           | - 27 -        |
| 2.1.11 Größenstandards für die Elektrophorese .....                | - 28 -        |
| 2.1.12 Plasmide .....  | - 28 -        |
| 2.1.13 Oligonukleotide .....                                       | - 28 -        |
| 2.1.14 Enzyme für die Molekularbiologie .....                      | - 30 -        |

|          |  |        |
|----------|--|--------|
| 2.1.15   | Antigene für proteinbiochemische Methoden .....  | - 30 - |
| 2.1.16   | Peptide für proteinbiochemische und zellbiologische Methoden .....   | - 30 - |
| 2.1.17   | Antikörper und Antikörperkonjugate .....   | - 31 - |
| 2.1.18   | Kit-Systeme .....  | - 31 - |
| 2.1.19   | Chemikalien und Reagenzien.....  | - 31 - |
| 2.1.20   | Puffer und Lösungen .....  | - 32 - |
| 2.2      | Methoden.....  | - 37 - |
| 2.2.1    | Molekularbiologische Methoden .....  | - 37 - |
| 2.2.1.1  | Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNS-Abschnitten .....  | - 37 - |
| 2.2.1.2  | Agarose-Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten .....   | - 38 - |
| 2.2.1.3  | Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....  | - 39 - |
| 2.2.1.4  | Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> -Zellen .....  | - 39 - |
| 2.2.1.5  | Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen .....  | - 39 - |
| 2.2.1.6  | Salz-Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren .....   | - 39 - |
| 2.2.1.7  | Isopropanol-Präzipitation von Nukleinsäuren .....  | - 39 - |
| 2.2.1.8  | Restriktion von DNS mittels Restriktionsendonukleasen .....  | - 40 - |
| 2.2.1.9  | Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten .....  | - 40 - |
| 2.2.1.10 | Hybridisierung von Oligonukleotiden .....  | - 40 - |
| 2.2.1.11 | Hybridisierung partiell überlappender Oligonukleotide und<br>Vervollständigung zu doppelsträngigen DNS-Molekülen ..... | - 40 - |
| 2.2.1.12 | Phosphorylierung von DNS-Fragmenten mittels Polynukleotidkinase .....  | - 40 - |
| 2.2.1.13 | Ligation von DNS-Fragmenten .....  | - 41 - |
| 2.2.1.14 | Klonierung mit dem TOPO-TA-Kit (Invitrogen).....   | - 41 - |
| 2.2.1.15 | Sequenzierung von DNS-Fragmenten .....   | - 41 - |
| 2.2.2    | Allgemeine mikrobiologische Methoden .....   | - 42 - |
| 2.2.2.1  | Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen .....   | - 42 - |
| 2.2.2.2  | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....  | - 42 - |
| 2.2.2.3  | Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNS .....  | - 43 - |
| 2.2.3    | Phagendisplay .....  | - 43 - |
| 2.2.3.1  | Verpackung von scFv-Antikörperfragment-Genbibliotheken.....  | - 43 - |
| 2.2.3.2  | Titration von Phagen.....  | - 44 - |
| 2.2.3.3  | <i>Panning</i> .....   | - 44 - |
| 2.2.3.4  | Reinfektion mit M13K07-Phagen .....  | - 44 - |
| 2.2.3.5  | Produktion von löslichen scFv-Antikörperfragmenten in Mikrotiterplatten .....  | - 45 - |
| 2.2.4    | Proteinproduktion in <i>Escherichia coli</i> .....   | - 46 - |
| 2.2.4.1  | Proteinproduktion in <i>E. coli</i> mittels Sekretion ins Periplasma: Produktion<br>in Schüttelkolben .....            | - 46 - |
| 2.2.4.2  | Proteinproduktion in <i>E. coli</i> mittels Sekretion ins Periplasma: Produktion<br>im Bioreaktor.....                 | - 46 - |

|           |   |               |
|-----------|---|---------------|
| 2.2.4.3   | Präparation von bakteriellen Zellmembranen.....   | - 47 -        |
| 2.2.4.4   | Proteinproduktion durch Rückfaltung bakterieller <i>Inclusion bodies</i> .....                            | - 48 -        |
| 2.2.4.5   | Proteinproduktion im Zytoplasma von <i>E. coli</i> -Zellen .....  | - 49 -        |
| 2.2.4.6   | Probenahme zur Kontrolle der Proteinproduktion .....  | - 50 -        |
| 2.2.5     | Proteinbiochemische Methoden .....  | - 50 -        |
| 2.2.5.1   | Dialyse und Umpufferung von Proteinlösungen über „Desalting-Säulen“ .....                                 | - 50 -        |
| 2.2.5.2   | Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....   | - 50 -        |
| 2.2.5.3   | Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....   | - 51 -        |
| 2.2.5.4   | Silberfärbung von SDS-Gelen .....   | - 51 -        |
| 2.2.5.5   | Western Blot und Immunfärbung .....   | - 52 -        |
| 2.2.5.6   | Affinitätschromatographische Proteinreinigung .....   | - 52 -        |
| 2.2.5.7   | Gelfiltration .....   | - 53 -        |
| 2.2.5.8   | Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....   | - 53 -        |
| 2.2.5.9   | ELISA .....   | - 53 -        |
| 2.2.6     | Zellbiologische Methoden .....  | - 54 -        |
| 2.2.6.1   | Zählung und Lagerung von Mammalia- und Insektenzellen .....   | - 54 -        |
| 2.2.6.2   | Kultivierung von Insektenzellen .....   | - 54 -        |
| 2.2.6.3   | Generierung von rekombinanten Baculoviren .....   | - 54 -        |
| 2.2.6.4   | Titerbestimmung von rekombinanten Baculoviren (Plaque Assay) .....  | - 55 -        |
| 2.2.6.5   | Amplifikation von Baculovirus-Titern .....  | - 55 -        |
| 2.2.6.6   | Proteinproduktion in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren .....                               | - 56 -        |
| 2.2.6.7   | Kultivierung und Passage von Mammalia-Zellen .....  | - 56 -        |
| 2.2.6.8   | Internalisierungsassay .....  | - 56 -        |
| 2.2.6.9   | Durchflussszytometrie .....   | - 57 -        |
| 2.2.6.10  | Zellbasierter NF-kappaB-Reporterassay .....   | - 57 -        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>- 59 -</b> |
| 3.1       | Proteinproduktion in Insektenzellen .....   | - 59 -        |
| 3.1.1     | Transfervektoren für die Generierung rekombinanter Baculoviren .....                                      | - 59 -        |
| 3.1.2     | Generierung rekombinanter Baculoviren .....   | - 60 -        |
| 3.1.3     | Produktion der Zielproteine in Insektenzellen .....   | - 62 -        |
| 3.2       | Produktion durch Sekretion ins Periplasma von <i>E. coli</i> .....  | - 63 -        |
| 3.2.1     | LS-Konstruktvarianten auf Basis des anti-CD71 scFvs IQ111-2 .....   | - 64 -        |
| 3.2.2     | Verteilung von <i>Ligand Sneaking</i> -Fusionsproteinen zwischen Membran- und<br>Zytoplasmafraktion ..... | - 67 -        |
| 3.2.3     | Isolation neuer anti-CD71 scFvs mittels Phagendisplay .....   | - 68 -        |
| 3.2.4     | Charakterisierung des anti-CD71 scFv TOM A6 .....   | - 69 -        |
| 3.2.5     | LS-Konstruktvarianten auf Basis des anti-CD71 scFv TOM A6 .....   | - 72 -        |

|           |  |                |
|-----------|--|----------------|
| 3.2.6     | Vergleich unterschiedlicher <i>Ligand Sneaking</i> -Konstrukte bezüglich der Ausbeute bei der Sekretion ins Periplasma.....      | - 74 -         |
| 3.2.7     | Charakterisierung der anti-CD71 scFvs aus der Bibliothek HAL4 .....  | - 76 -         |
| 3.2.8     | Klonierung von LS-Konstruktvarianten mit dem anti-CD71 scFv SH83-A7 und dem anti-MUC1 scFv HT186-D11 .....                       | - 80 -         |
| 3.2.9     | Produktion der LS-Fusionsproteine auf Basis des anti-CD71 scFv SH83-A7 und des anti-MUC1 scFv HT186-D11 .....                    | - 82 -         |
| 3.2.10    | Evaluierung der LS-Konstrukte basierend auf den scFvs SH83-A7 und HT186-D11 in Durchflusszytometrie und NF-kappaB-Zellassay..... | - 85 -         |
| 3.3       | Rückfaltung bakterieller <i>Inclusion bodies</i> .....   | - 89 -         |
| 3.3.1     | Klonierung des Vektors pET21 LS7-IQ111-2 .....   | - 89 -         |
| 3.3.2     | Produktion, Reinigung und Rückfaltung der bakteriellen <i>Inclusion bodies</i> .....   | - 90 -         |
| 3.4       | Produktion im Zytoplasma von <i>E. coli</i> -Stämmen mit oxidativem Milieu.....  | - 93 -         |
| 3.4.1     | Klonierung der Konstrukte in den pET21-Vektor.....   | - 94 -         |
| 3.4.2     | Produktion und Aufreinigung unterschiedlicher Varianten der LS-Fusionsproteine .....   | - 95 -         |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>- 98 -</b>  |
| 4.1       | Das <i>Ligand Sneaking</i> -Konzept.....   | - 98 -         |
| 4.2       | Produktion von <i>Ligand Sneaking</i> -Fusionsproteinen durch Sekretion .....  | - 99 -         |
| 4.2.1     | Produktion in eukaryotischen Expressionssystemen .....   | - 99 -         |
| 4.2.2     | Produktion in <i>Escherichia coli</i> .....  | - 100 -        |
| 4.3       | Produktion von <i>Ligand Sneaking</i> -Fusionsproteinen im Zytoplasma von <i>Escherichia coli</i> .....                          | - 103 -        |
| 4.3.1     | Rückfaltung bakterieller <i>Inclusion bodies</i> .....   | - 103 -        |
| 4.3.2     | Produktion im Zytoplasma von <i>E. coli</i> -Stämmen mit oxidativem Zytoplasma-Milieu.....                                       | - 104 -        |
| 4.4       | Ausblick .....   | - 105 -        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung / Summary .....</b>   | <b>- 108 -</b> |
| 5.1       | Zusammenfassung .....  | - 108 -        |
| 5.2       | Summary .....  | - 109 -        |
| <b>6.</b> | <b>Literatur .....</b>   | <b>- 110 -</b> |



## Abbildungsverzeichnis

|   |        |
|---|--------|
| Abb. 1.1-1: Struktur von IgG-Antikörpern und Fragmenten (aus: Dübel <i>et al.</i> , 2007).....  | - 2 -  |
| Abb. 1.2-1: Ansätze in der Krebs-Immuntherapie (verändert aus: Schrama <i>et al.</i> , 2006).....   | - 5 -  |
| Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung des <i>Ligand Sneaking</i> -Konzeptes.....   | - 7 -  |
| Abb. 1.3-2: Struktureller Aufbau des <i>Ligand Sneaking</i> -Fusionsproteins und des <i>Pseudomonas</i><br>Exotoxin A im Vergleich .....    | - 7 -  |
| Abb. 1.3-3: Struktur des <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A .....  | - 10 - |
| Abb. 1.3-4: NF-kappaB- und IkappaB-Proteine (verändert aus: Voll und Hantschel, 2001).....  | - 12 - |
| Abb. 1.3-5: Aktivatoren und Zielgene von NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren.....  | - 13 - |
| Abb. 1.3-6: Drei Wege zur Aktivierung der NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren (verändert aus:<br>Schmitz <i>et al.</i> , 2004).....            | - 14 - |
| Abb. 1.3-7: Möglichkeiten zur Unterbrechung des NF-kappaB-Signaltransduktionsweges<br>(verändert aus: D'Acquisto <i>et al.</i> , 2002)..... | - 16 - |
| Abb. 1.4-1: Proteinexport und -faltung in <i>Escherichia coli</i> (aus: Baneyx und Mujacic, 2004)....                                       | - 18 - |
| Abb. 3.1-1: Konstrukte im Transfektor pFastBac .....  | - 60 - |
| Abb. 3.1-2: Schritte zur Generierung von rekombinanten Baculoviren .....  | - 61 - |
| Abb. 3.1-3: Schritte zur Generierung von rekombinanten Baculoviren .....  | - 61 - |
| Abb. 3.1-4: Proteinproduktion in Sf9-Insektenzellen .....   | - 62 - |
| Abb. 3.1-5: Aufreinigung und Spezifität des anti-CD71 scFvs aus Insektenzellproduktion .....  | - 63 - |
| Abb. 3.2-1: Produktion, Aufreinigung und Spezifität des LS-Fusionsproteins LS7-IQ111-2.....   | - 65 - |
| Abb. 3.2-2: Konstrukte basierend auf dem anti-CD71 scFv IQ111-2 im Vektor pOPE101.....  | - 66 - |
| Abb. 3.2-3: Verteilung der LS-Fusionsproteine zwischen Membran- und Zytoplasmafraktion .  | - 67 - |
| Abb. 3.2-4: Isolation von scFv-Antikörperfragmenten aus der Tomlinson-Bibliothek .....  | - 69 - |
| Abb. 3.2-5: Produktion des anti-CD71 scFv TOM A6 .....  | - 70 - |
| Abb. 3.2-6: Detektion von CD71 durch TOM A6 scFv im Western Blot.....   | - 71 - |
| Abb. 3.2-7: Analyse des anti-CD71 scFvs TOM A6 in der Durchflusszytometrie .....  | - 72 - |
| Abb. 3.2-8: Konstrukte basierend auf dem anti-CD71 scFv TOM A6 im Vektor pOPE101 .....  | - 73 - |
| Abb. 3.2-9: Vergleich der Sekretionsfähigkeit von LS-Fusionsproteinen basierend auf den anti-<br>CD71 scFvs IQ111-2 und TOM A6 .....        | - 75 - |
| Abb. 3.2-10: Charakterisierung der anti-CD71 scFvs aus der scFv-Antikörperfragment-<br>Genbibliothek HAL4 .....                             | - 77 - |

|   |        |
|---|--------|
| Abb. 3.2-11: Durchflusszytometrische Analyse der anti-CD71 scFvs aus der scFv-Antikörperfragment-Genbibliothek HAL4 .....   | - 78 - |
| Abb. 3.2-12: Internalisierung des anti-CD71 scFvs SH83-A7 .....   | - 79 - |
| Abb. 3.2-13: Konstruktvarianten basierend auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 im Vektor pOPE101 .....  | - 81 - |
| Abb. 3.2-14: Vergleich der Ausbeute von LS-Fusionsproteinen basierend auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 und dem anti-MUC1 scFv HT186-D11 bei Sekretion ins Periplasma .... | - 83 - |
| Abb. 3.2-15: Produktion des Fusionsproteins LSdeltaNBD-SH83-A7 im Bioreaktor .....  | - 84 - |
| Abb. 3.2-16: Aufgereinigte Fusionsproteine auf Basis der scFvs SH83-A7 und HT186-D11 ...  | - 85 - |
| Abb. 3.2-17: Durchflusszytometrische Analyse der LS-Konstrukte auf Basis der scFvs SH83-A7 und HT186-D11 .....  | - 87 - |
| Abb. 3.2-18: Ergebnisse des NF-kappaB-Reporterzellassays .....  | - 88 - |
| Abb. 3.3-1: Das Konstrukt LS7-IQ111-2 im Vektor pET21 .....   | - 89 - |
| Abb. 3.3-2: Produktion des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 in <i>E. coli</i> BLR(DE3)-Zellen .....  | - 90 - |
| Abb. 3.3-3: Aufreinigung und Spezifität des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 aus <i>E. coli</i> BLR(DE3)-Zellen .....  | - 91 - |
| Abb. 3.3-4: Spezifität des rückgefalteten Zielproteins nach Gelfiltration .....   | - 92 - |
| Abb. 3.4-1: LS-Konstruktvarianten im Vektor pET21 .....   | - 94 - |
| Abb. 3.4-2: Produktion von LS-Fusionsproteinen mit <i>E. coli</i> Rosetta-gami(DE3) .....   | - 96 - |
| Abb. 3.4-3: Spezifität des Zielproteins aus der Produktion in <i>E. coli</i> Rosetta-gami(DE3) .....  | - 97 - |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| #x g           | #-fache Erdbeschleunigung                       |
| Abb.           | Abbildung                                       |
| ADCC           | <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> |
| ADEPT          | <i>antibody directed enzyme prodrug therapy</i> |
| ADP            | Adenosindiphosphat                              |
| AP             | <i>adaptor protein</i>                          |
| AP             | alkalische Phosphatase                          |
| APS            | Ammoniumperoxodisulfat                          |
| ATP            | Adenosintriphosphat                             |
| BAFF           | <i>B-cell activating factor</i>                 |
| BCIP           | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat              |
| bp             | Basenpaar(e)                                    |
| BSA            | Bovines Serum-Albumin                           |
| CD##           | <i>cluster of differentiation</i>               |
| CDC            | <i>complement dependent cytotoxicity</i>        |
| CDR            | <i>complementarity determining region</i>       |
| CER            | <i>carbon dioxide evolution rate</i>            |
| cfu            | <i>colony forming unit(s)</i>                   |
| C <sub>H</sub> | konstante Region der schweren Ketten            |
| CHO            | <i>chinese hamster ovary</i>                    |
| c-IAP          | <i>cellular inhibitor of apoptosis</i>          |
| CIP            | <i>calf intestine phosphatase</i>               |
| C <sub>L</sub> | konstante Region der leichten Kette             |
| CLL            | Chronische Lymphozytische Leukämie              |
| COX            | Cyclooxygenase                                  |
| DAPI           | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                    |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                |
| DMT            | <i>divalent metal transporter</i>               |
| DNase          | Desoxyribonuklease                              |
| DNS            | Desoxyribonukleinsäure                          |
| dNTP           | Desoxyribonukleotidtriphosphat(e)               |
| EDTA           | <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>        |
| eEF            | <i>eukaryotic elongation factor</i>             |
| EGFR           | <i>epidermal growth factor receptor</i>         |
| ELISA          | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>        |
| EMA            | <i>European Medicines Agency</i>                |
| EMSA           | <i>electrophoretic mobility-shift assay</i>     |

|                |  |
|----------------|--|
| ER             | endoplasmatisches Retikulum                              |
| ETA            | Endotoxin A  |
| Fab            | <i>Fragment antigen binding</i>                          |
| FACS           | <i>fluorescence activated cell sorting</i>               |
| Fc             | <i>Fragment crystallizable</i>                           |
| FCS            | <i>fetal calf serum</i>                                  |
| f <sub>D</sub> | Verdünnungsfaktor ( <i>dilution factor</i> )             |
| FDA            | <i>Food and Drug Administration</i>                      |
| FITC           | Fluorescein-Isothiocyanat                                |
| FPLC           | <i>fast protein liquid chromatography</i>                |
| GM-CSF         | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>  |
| GTP            | Guanosintriphosphat                                      |
| HAMA           | <i>human anti mouse antibody</i>                         |
| HEK            | <i>human embryonic kidney</i>                            |
| HIV            | <i>human immunodeficiency virus</i>                      |
| HRP            | <i>horseradish peroxidase</i>                            |
| HZI            | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) |
| IB             | <i>inclusion bodies</i>                                  |
| ICAM           | <i>intercellular adhesion molecule</i>                   |
| Ig             | Immunglobulin  |
| I $\kappa$ B   | <i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>              |
| IKK            | <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>                      |
| IL             | Interleukin  |
| IMAC           | <i>immobilised metal ion affinity chromatography</i>     |
| iNOS           | Induzierbare NO-Synthase                                 |
| IPTG           | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid              |
| kDa            | Kilodalton   |
| LPS            | Lipopolysaccharid  |
| LS             | <i>Ligand Sneaking</i>                                   |
| MAP            | <i>mitogen-activated protein kinase</i>                  |
| mAU            | <i>milli absorption units</i>                            |
| MOI            | <i>multiplicity of infection</i>                         |
| MWCO           | <i>molecular weight cut off</i>                          |
| NBD            | <i>NEMO binding domain</i>                               |
| NBT            | Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid                            |
| NEMO           | <i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>       |
| NF- $\kappa$ B | <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>               |
| NGF            | <i>neuronal growth factor</i>                            |
| NIK            | <i>NF-<math>\kappa</math>B inducing kinase</i>           |

|                |  |
|----------------|--|
| NLS            | <i>nuclear localisation sequence</i>                                 |
| NSAID          | <i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i>                          |
| OD             | optische Dichte  |
| OUR            | <i>oxygen uptake rate</i>  |
| PAGE           | <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>                            |
| PBS            | <i>phosphate buffered saline</i>                                     |
| PCR            | <i>polymerase chain reaction</i>                                     |
| PEG            | Polyethylenglykol  |
| PPP            | periplasmatische Proteinpräparation                                  |
| RHD            | Rel-Homologie-Domäne   |
| RNAse          | Ribonuklease   |
| rpm            | <i>revolutions per minute</i>  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| scFv           | <i>single chain Fragment variable</i>                                |
| SDS            | <i>sodium dodecyl sulfate</i>  |
| SRP            | <i>signal recognition particle</i>                                   |
| TAT            | <i>transactivator</i>  |
| TAT            | <i>twin arginine translocation</i>                                   |
| TEMED          | Tetramethylethylendiamin   |
| TFR            | Transferrinrezeptor  |
| TIRAP          | <i>Toll-interleukin 1 receptor-domain-containing adaptor protein</i> |
| TLR            | <i>Toll-like receptor</i>  |
| TMB            | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  |
| TNF            | Tumor Nekrose Faktor   |
| TRAF           | <i>TNF receptor-associated factor</i>                                |
| VCAM           | <i>vascular cell adhesion molecule</i>                               |
| VEGF           | <i>vascular endothelial growth factor</i>                            |
| V <sub>H</sub> | <i>variable domain heavy chain</i>                                   |
| V <sub>L</sub> | <i>variable domain light chain</i>                                   |

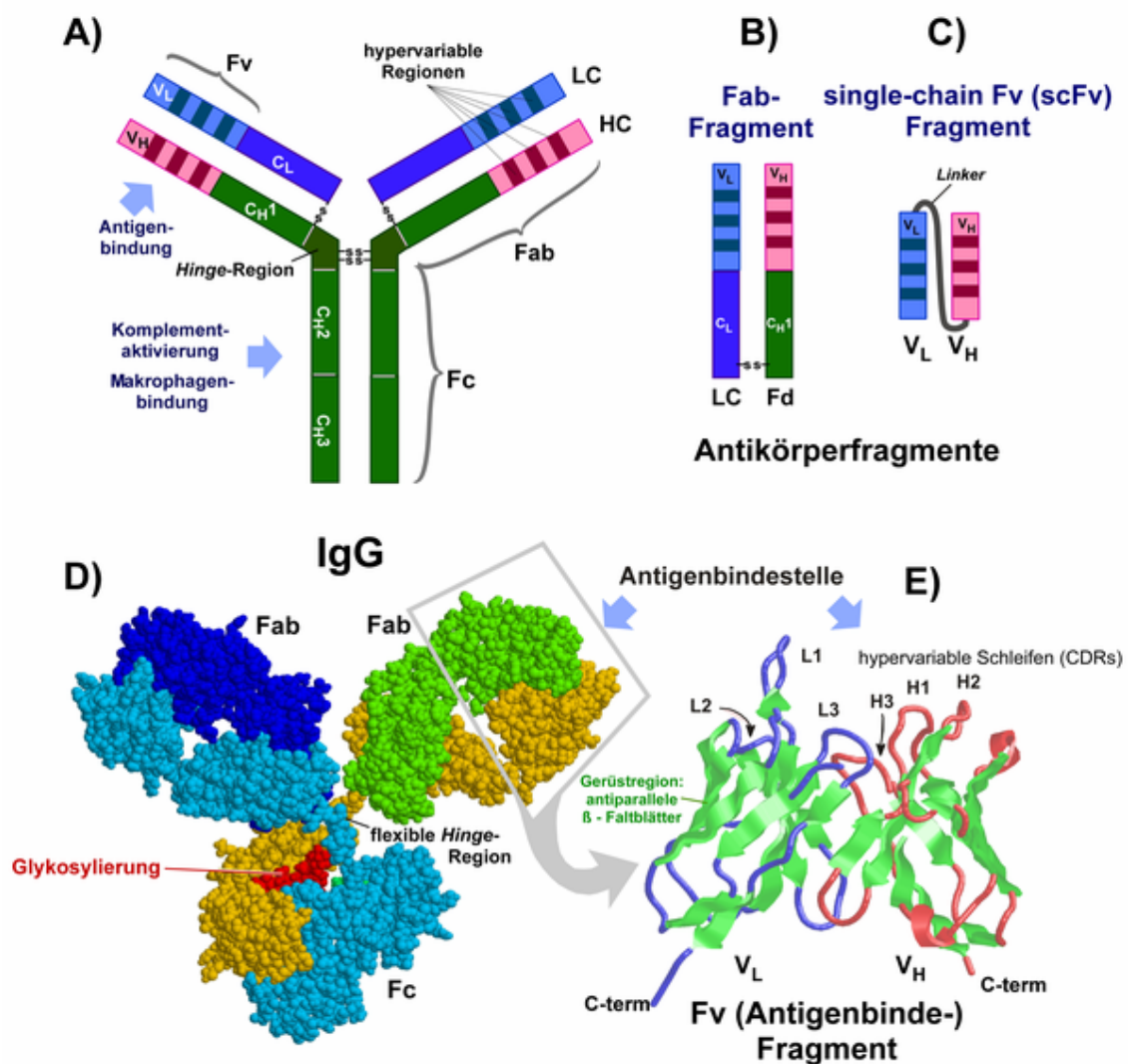
# 1. Einleitung

## 1.1 Antikörper und rekombinante Antikörperformate

Antikörper (Immunglobuline) bilden in Vertebraten ab der Überklasse der Kiefermänder (*Gnathostomata*) die Bestandteile der humoralen Antwort des adaptiven Immunsystems auf die Invasion von pathogenen Fremdkörpern. Antikörper sind lösliche Proteine, die spezifisch an Oberflächenstrukturen (Epitope) auf Zielmolekülen (Antigenen) binden. Es lassen sich beim Menschen hinsichtlich der Struktur, Funktion und Verteilung im Gewebe fünf unterschiedliche Arten von Antikörpern unterscheiden (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM), die teils in weitere Subklassen unterteilt werden (IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4). Antikörper werden zunächst als Oberflächenrezeptoren vom Isotyp IgM von B-Lymphozyten gebildet. Jede B-Zelle präsentiert einen anderen Rezeptor, was durch somatische Neukombination von Gensegmenten in jeder einzelnen Zelle ermöglicht wird. Nach Antigenkontakt wird durch die klonale Deletion von B-Lymphozyten mit autoreaktiven Rezeptoren und die klonale Selektion von B-Zellen mit Fremdanigen-bindenden Rezeptoren sowie weitere regulatorische Prozesse eine Eigen-/Fremdunterscheidung etabliert. Durch den Prozess der somatischen Hypermutation werden hochaffine Varianten des ursprünglichen B-Zellrezeptors gebildet. Die aktivierten B-Zellen differenzieren z. T. zu Plasmazellen, die Antikörper als sezernierte Form des B-Zellrezeptors produzieren, wobei der Isotyp der Antikörper wechselt. Mit ca. 80% der im Serum vorhandenen Immunglobuline machen IgG-Antikörper den größten Anteil aus (Janeway *et al.*, 2005).

Humane IgG-Antikörper (Abb. 1.1-1) sind Heterotetramere aus jeweils zwei identischen leichten Ketten (LC, *light chains*) und zwei identischen schweren Ketten (HC, *heavy chains*). Jede leichte Kette ist über eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verbunden, während die schweren Ketten durch zwei Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Ketten sind aus sog. Immunglobulin-Domänen aufgebaut, deren Tertiärstruktur auf antiparallelen beta-Faltblättern basiert und die je eine intramolekulare Disulfidbrücke enthalten. Es gibt zwei Subtypen von leichten Ketten, kappa ( $\kappa$ ) und lambda ( $\lambda$ ), die jeweils aus einer N-terminalen variablen Domäne ( $V_L$  bzw.  $V_\kappa$ ,  $V_\lambda$ ) und einer C-terminalen konstanten Domäne ( $C_L$  bzw.  $C_\kappa$ ,  $C_\lambda$ ) bestehen. Die schwere Kette eines IgG-Antikörpers wird aus einer N-terminalen variablen Domäne ( $V_H$ ) und drei konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) gebildet. In den variablen Domänen je einer schweren und einer leichten Kette liegen eingebettet in Gerüstbereiche mit geringer Variabilität drei hypervariable Schleifen, die sog. komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR, *complementary determining regions*), die sich durch hohe Sequenzunterschiede beim Vergleich unterschiedlicher Antikörper auszeichnen. Sie bilden die Bindungsstelle an das Epitop auf dem Antigen, das sog. Paratop (Janeway *et al.*, 2005).

Im IgG1-Antikörper werden die  $C_{H1}$ - und die  $C_{H2}$ -Domäne durch einen flexiblen Bereich, die sog. *hinge*-Region, verbunden. In diesem Bereich verbinden zwei intermolekulare Disulfidbrücken die beiden schweren Ketten. Die Einheit aus  $V_H$  und  $C_{H1}$  wird als Fd-Teil bezeichnet, Fd-Teil und leichte Kette bilden zusammen das Fab-Fragment (*fragment antigen binding*). Die Einheit aus den beiden variablen Domänen der leichten und schweren Kette wird Fv-Fragment (*fragment variable*), die Einheit aus  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  der beiden schweren Ketten als Fc-Teil (*fragment crystallizable*) bezeichnet. Der Fc-Teil vermittelt Effektorfunktionen wie die Bindung von anderen Zellen des Immunsystems (z. B. Makrophagen) oder die Aktivierung des Komplementsystems. Wichtig dafür ist die Glykosylierung an der  $C_{H2}$ -Domäne (Janeway *et al.*, 2005).



**Abb. 1.1-1: Struktur von IgG-Antikörpern und Fragmenten (aus: Dübel *et al.*, 2007)**

**A) humaner IgG1-Antikörper** (schematisch) **B) Fab-Fragment** (schematisch) **C) scFv-Fragment** (schematisch) **D) IgG-Antikörper** (räumliches Modell nach Röntgenkristallanalyse) **E) Fv-Fragment** eines IgG-Antikörpers (schematische Bänder-Darstellung des Aminosäuresequenzgerüsts nach Röntgenkristallanalyse)

Die Produktion von Antikörpern für diagnostische und therapeutische Zwecke hat sich im 20. Jahrhundert deutlich weiterentwickelt. Zu Anfang wurden polyklonale Antikörper aus den Seren immunisierter Tiere gewonnen, z. B. um Menschen passiv zu immunisieren. Ein Meilenstein in der Herstellung von Antikörpern war die Entwicklung der Hybridoma-Technologie (Köhler und Milstein, 1975). Hierbei werden Mäuse mit einem Antigen immunisiert und einzelne B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert. Erfolgreich fusionierte, immortalisierte Zellen (Hybridomazellen) werden selektioniert und dienen als Quelle affinitätsgereifter, monoklonaler Antikörper murinen Ursprungs (*monoclonal antibodies*, mAbs). Bei der Anwendung im Menschen führten monoklonale Maus-Antikörper allerdings zu unerwünschten Reaktionen des menschlichen Immunsystems (HAMA-Antwort, *human anti-mouse antibody*-Antwort). Um Antikörper für Therapieansätze mit mehrfacher Verabreichung bei Menschen einsetzen zu können, wurden Methoden zur Manipulation der Antikörpersequenzen auf genetischer Ebene entwickelt. Ziel war es, die Aminosäuresequenz weniger immunogen zu gestalten und gleichzeitig die Bindungsselektivität sowie –affinität zu erhalten (Humanisierung). Parallel wurden rekombinante Antikörperformate und Methoden für die Herstellung von Antikörpern in heterologen Expressionssystemen entwickelt.

Zwecks Humanisierung wurden zunächst die Fv-Fragmente von monoklonalen Maus-Antikörpern mit den konstanten Bereichen von humanen Antikörpern zusammengesetzt, was zu sog. chimärisierten Antikörpern führte (Boulianne *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1984). Den nächsten Schritt stellte die Einbettung der CDRs eines murinen Antikörpers in die Gerüstregionen menschlicher Antikörper (*CDR-grafting*) dar (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988). Die Generierung von Antikörpern mit vollständig humanem Ursprung wurde möglich durch die Einführung humaner Ig-Genloci in IgG-*knock out*-Mäuse (Green *et al.*, 1994; Lonberg *et al.*, 1994) und durch die *in vitro*-Selektion von Antikörpern mittels Phagendisplay aus humanen Antikörpergenbibliotheken (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991). Beim Phagendisplay werden Antikörperfragmente auf Hüllproteinen von Bakteriophagen präsentiert, die das Gen des präsentierten Antikörpers enthalten. Auf diesem Wege findet eine Kopplung von präsentiertem Protein und zugehörigem Gen statt. Durch Affinitätsanreicherung auf immobilisierten Antigenen lassen sich *in vitro* aus Genbibliotheken Gene isolieren, welche für Antikörper kodieren, die gegen diese Antigene gerichtet sind. Derartige Genbibliotheken können auf dem humanen Antikörpergenrepertoire beruhen und eine hohe Zahl (bis zu  $10^{11}$ ) von unterschiedlichen Antikörpergenen enthalten (Sblattero und Bradbury, 2000). Die Methode erlaubt die Selektion von Antikörpern gegen beliebige Antigene, auch gegen toxische, mit denen eine Immunisierung von Tieren nicht möglich ist. Auch kreuzreaktive Antikörper können selektiert werden, deren Wirksamkeit dann in *in vivo*-Maus-Modellen geprüft werden kann. Neben dem Fab-Fragment ist das sog. scFv-Antikörperfragment (Abb. 1.1-1 C), bei dem die Domänen eines Fv-Fragments durch eine flexible *Linker*-Sequenz verbunden werden (Huston *et al.*, 1988), eines der am häufigsten für das Phagendisplay eingesetzten rekombinanten Antikörperformate. Außer dem Phagendisplay wurden weitere Displaytechnologien entwickelt, wie z. B. die Präsentation auf der Oberfläche von Bakterien oder Hefen (Jostock und Dübel, 2005) sowie das sog. Ribosomendisplay, welches ein zellfreies



Displaysystem darstellt (Hanes und Plückthun, 1997). Durch wiederholte Zyklen von Mutation selektierter Antikörpergene und erneuter Selektion mittels Displaytechnologien lassen sich Antikörper mit bis zu femtomolaren Affinitätskonstanten isolieren (Boder *et al.*, 2000).

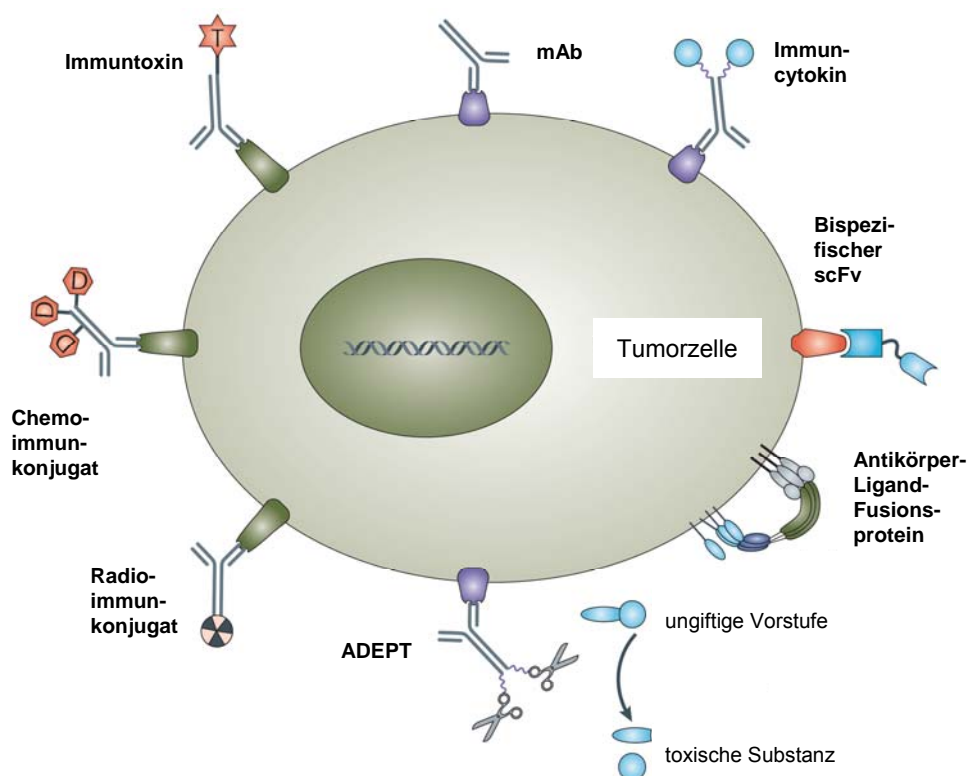
## 1.2 Biopharmazeutika und Antikörper-basierte Therapieansätze

Biopharmazeutika machen einen wachsenden Anteil am weltweiten Markt für pharmazeutische Produkte aus. Weltweit wurden im Jahr 2006 durch biotechnologische Produkte Umsätze im Wert von über 73 Mrd. US\$ generiert, über 190.000 Menschen waren in Firmen in diesem Sektor beschäftigt (Ernst&Young, 2007). Monoklonale Antikörper und ihre Derivate stellen den wichtigsten Bestandteil der Biopharmazeutika auf dem Markt dar (Dübel, 2007). Die amerikanische Zulassungsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) listet auf ihrer Internetpräsenz ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) 25 monoklonale Antikörper oder davon abgeleitete Produkte wie Fab-Fragmente, Radioimmunkonjugate (z. B. Zevalin, Bexxar) oder Immuntoxine (Mylotarg). Die europäische Zulassungsbehörde EMEA (*European Medicines Agency*), listet 18 derartiger Produkte auf ihrer Internetpräsenz ([www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu)) (Stand: Mai 2008).

Mehrere Antikörper wurden für die Krebstherapie zugelassen (Schrama *et al.*, 2006), darunter chimärisierte (z. B. Erbitux, Rituxan) und humanisierte (z. B. Avastin, Herceptin, Leukosite) IgG-Antikörper. Die Antikörper binden an Antigene, die auf Krebszelloberflächen überexprimiert werden, oder an Antigene, die auf den Blutgefäßen zugänglich sind, die einen Tumor versorgen (Angiogenesehemmer). Über den Fc-Teil werden Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und NK-Zellen aktiviert und die markierten Zellen zerstört oder das Komplementsystem aktiviert (zellulär-vermittelte antikörperabhängige Zytotoxizität, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC; bzw. Komplementsystem-vermittelte Zytotoxizität, *complement dependent cytotoxicity*, CDC). In der Forschung befinden sich bispezifische Antikörperformate, die mit einer Antigenbindungsstelle an das tumor-assoziierte Antigen und mit der anderen an ein Antigen auf einer Zelle des Immunsystems (z. B. auf zytotoxischen T-Zellen) binden. Derartige Ansätze zielen auf eine aktivere Rekrutierung und Aktivierung der Immunzellen im Bereich des Tumors ab (Kontermann, 2005).

Es gibt Ansätze, durch Konjugation von Antikörpern mit anderen Substanzen die Antikörper-vermittelte Spezifität mit effektiveren Mechanismen zur Bekämpfung der Krankheit zu kombinieren (Abb. 1.2-1). Immunzytokine, d. h. Konjugate von Antikörpern und Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2), zielen ebenfalls auf die Aktivierung des Immunsystems an Tumorgewebe ab. Einige zugelassene Präparate (z. B. Bexxar, Zevalin) sind Radioimmunkonjugate, also Antikörper, welche mit radioaktiven Isotopen konjugiert wurden, deren Strahlung die Zellen von soliden Tumoren schädigen soll. Hier wird der sog. „*bystander*-Effekt“ genutzt, d. h. es wird nicht allein die Tumorzelle mit dem tumor-assoziierten Antigen auf der Oberfläche angegriffen, sondern auch eine Schädigung von in der Umgebung befindlichen Tumor- bzw. Blutgefäßzellen beabsichtigt, die das Antigen u. U. nicht präsentieren. Ein weiteres Prinzip in der Forschung, das einen *bystander*-Effekt nutzt, bislang aber noch nicht zu zugelassenen Präparaten geführt hat, ist das sog. ADEPT-Konzept (*antibody-directed*

*enzyme prodrug therapy*). Hier werden Antikörper, die gegen tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind, mit Enzymen konjugiert. Nach Markierung der Tumoren mit den Antikörpern wird über das Blutsystem eine nicht-membrangängige und nicht-toxische Substanz in den Patienten eingeführt, die am Ort des Tumors durch das gekoppelte Enzym in eine toxische, membrangängige Substanz umgewandelt wird und selektiv Zellen im Tumorbereich schädigt. Die toxische Wirkung wird also nur am Ort des Tumors entwickelt, wohingegen während der Zirkulation des Konjugates im Blut und der Anreicherungsphase am Tumor keine schädlichen Nebenwirkungen auftreten können, solange nicht endogene Enzyme die nicht-toxische Substanz umwandeln (Bagshawe *et al.*, 2004). Um allein Zellen mit tumor-assoziierten Antigenen auf der Oberfläche anzugreifen, werden Antikörper auch mit Toxinen konjugiert (z. B. Mylotarg). Für derartige Immuntoxine versucht die Forschung, neben chemischen Substanzen auch hochwirksame toxische Enzyme aus Bakterien (z. B. das Diphtheria-Toxin oder das *Pseudomonas* Exotoxin A) oder Pflanzen (z. B. Ricin) mit der Spezifität von Antikörpern zu kombinieren (Pastan *et al.*, 2007). Um die mit diesen Molekülen verbundene Immunogenität zu verringern, wird die Verwendung von humanen RNAsen als toxische Effektoren untersucht (Newton und Rybak, 2001; Arndt *et al.*, 2005; Krauss *et al.*, 2005a; Krauss *et al.*, 2005b; Menzel *et al.*, 2008). Schließlich gibt es Ansätze, bei denen Antikörper mit Liganden (z. B. FasL oder TRAIL) konjugiert werden, die bei der Bindung an Rezeptoren an der Tumorzelloberfläche die Apoptose der Zelle auslösen sollen (Schrama *et al.*, 2006).



**Abb. 1.2-1: Ansätze in der Krebs-Immuntherapie (verändert aus: Schrama *et al.*, 2006)**

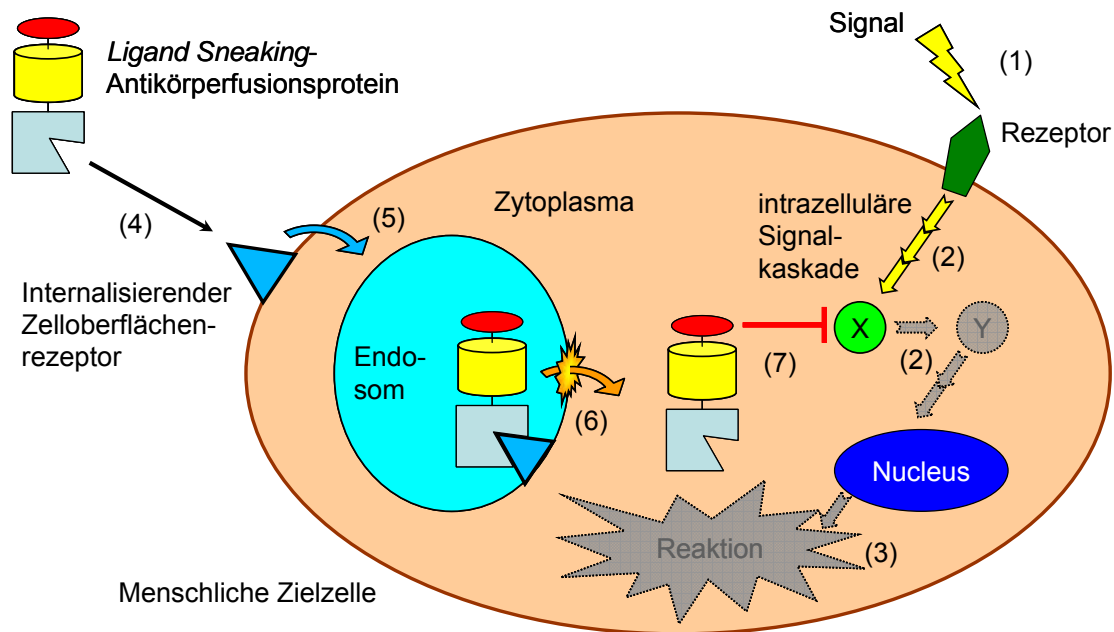
In der Krebstherapie, aber auch bei inflammatorischen Krankheitsbildern wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, kann die Verhinderung der Wechselwirkung von Liganden mit ihren Rezeptoren durch Bindung von unkonjugierten Antikörpern einen erfolgreichen Therapieansatz darstellen. Entweder können die löslichen Liganden im Blut (z. B. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) durch Avastin oder Lucentis, TNF (*tumor necrosis factor*)-alpha durch Humira oder Remicade) oder aber die Rezeptoren an der Zelloberfläche blockiert werden. Auch kann die Multimerisierung von Rezeptoren durch deren Bindung verhindert und somit die Rezeptoraktivierung unterbunden werden, wie z. B. im Falle vom Rezeptor HER-2/neu durch Herceptin (Adams und Weiner, 2005).

### 1.3 Das *Ligand Sneaking*-Konzept

Antikörper und die meisten auf Antikörpern basierenden therapeutischen Proteine können, selbst wenn sie an internalisierende Antigene binden, von sich aus nicht vom Endosom in das Zytoplasma von Zellen übertreten, wodurch therapeutisch interessante, intrazelluläre Zielproteine nicht erreichbar sind. Eine Ausnahme bilden Antikörper-RNase-Konjugate, bei denen der Mechanismus des Eindringens in das Zytoplasma bislang nicht geklärt ist (Newton und Rybak, 2001; Arndt *et al.*, 2005; Krauss *et al.*, 2005a; Krauss *et al.*, 2005b; Menzel *et al.*, 2008).

Das *Ligand Sneaking*-Konzept (Broders, 2004) zielt darauf ab, Effektormoleküle als Teil eines Antikörperfusionsproteins in das Zytoplasma von Zielzellen einzuschleusen, um dort Signaltransduktionswege zu unterbrechen (Abb. 1.3-1). Damit sollen innere Zellkompartimente wie das Zytoplasma als Zielkompartiment für therapeutische Ansätze erschlossen werden. Das *Ligand Sneaking*-Fusionsprotein lässt sich in drei Teile gliedern (Abb. 1.3-2): Mit Hilfe eines scFv-Antikörperfragmentes als erstem Teil soll es an einen internalisierenden Rezeptor an der Oberfläche der Zielzelle binden und mit diesem zusammen in ein Endosom gelangen. Den zweiten Teil bildet die Translokationsdomäne ETA II aus dem *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA), die den Übertritt des Effektormoleküls, das den dritten Teil des Fusionsproteins bildet, aus dem Endosom in das Zytoplasma vermittelt, damit das Effektormolekül dort seine Wirkung ausüben kann.

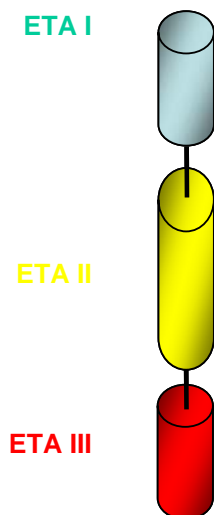
Das Konzept wurde anhand eines Antikörperfusionsproteins entwickelt, mit dem der NF-kappaB-Signaltransduktionsweg in Zellen unterbrochen und so die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kappaB gesenkt werden sollte (Broders, 2004). Für den ersten Nachweis der Funktionalität des Konzeptes wurde ein Gen für ein Fusionsprotein mit einem gegen den Transferrinrezeptor gerichteten scFv-Antikörperfragment (scFv-Klon IQ111-2) kloniert, welches aus einem chimärisierten IgG (Hoogenboom *et al.*, 1990) kloniert wurde und murinen Ursprungs ist. Der Transferrinrezeptor findet sich auf der Oberfläche von allen proliferierenden Zellen und wird sehr effektiv internalisiert, weshalb sich dieser Rezeptor für eine Etablierung des Systems mit einfach handhabbaren Zellen eignet.



**Abb. 1.3-1: Schematische Darstellung des Ligand Sneaking-Konzeptes**

Registriert eine menschliche Zelle ein bestimmtes Signal durch einen Rezeptor an ihrer Zelloberfläche (1), kann dies eine intrazelluläre Signalkaskade (2) auslösen, in deren Folge ein bestimmtes genetisches Programm ausgelöst wird (3), mit dem die Zelle auf das von außen kommende Signal reagiert. Das *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsprotein soll die intrazelluläre Signalkaskade unterbrechen und damit die Reaktion unterbinden. Dazu soll es an einen internalisierenden Zelloberflächenrezeptor binden (4) und zusammen mit diesem Rezeptor in das Endosom gelangen (5). Ein Teil des Proteins soll den Übertritt des Proteins aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zielzelle katalysieren, wobei die Membran überwunden werden muss (6). Ist die Effektordomäne des Fusionsproteins im Zytoplasma angekommen, soll sie dort mit einer Komponente X der intrazellulären Signalkaskade interagieren (7), wodurch die Signalkaskade unterbrochen wird.

#### *Pseudomonas* Exotoxin A

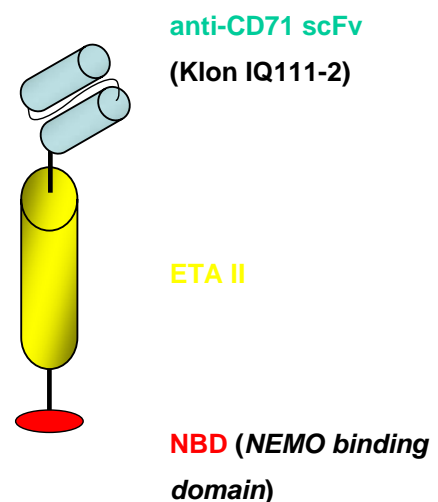


**Domäne / Teil I:**  
Bindung an Zelloberflächenrezeptor  
→ Vermittlung der Endozytose

**Domäne II:**  
Vermittlung der Translokation

**Domäne III:**  
Effektorfunktion

#### *Ligand Sneaking*-Fusionsprotein



**Abb. 1.3-2: Struktureller Aufbau des Ligand Sneaking-Fusionsproteins und des *Pseudomonas* Exotoxin A im Vergleich**

Für die Überwindung der endosomalen Membran wurde die Translokationsdomäne ETA II des *Pseudomonas* Exotoxin A in das *Ligand Sneaking*-Protein eingebaut und der Aufbau des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins der strukturellen Organisation des Toxins nachempfunden (Abb. 1.3-2). Als Effektormolekül diente NBD (*NEMO binding domain*), welches die Bildung des I $\kappa$ B-Kinasekomplexes unterbinden sollte, der die Aktivierung von NF- $\kappa$ B reguliert (May *et al.*, 2000). Die einzelnen Teile des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins werden im folgenden näher vorgestellt.

### 1.3.1 Internalisierung durch den humanen Transferrinrezeptor

Durch die Bindung an den Transferrinrezeptor mit dem N-terminalen scFv-Anteil gelangt das *Ligand Sneaking*-Fusionsprotein in ein Endosom in der Zielzelle. Der Transferrinrezeptor ist das zentrale Protein, über welches der Eisenimport in die Zellen von Säugetieren reguliert wird. Der humane Transferrinrezeptor 1 (hTFR1, CD71) ist ein membranständiges Glykoprotein und liegt nativ als Homodimer vor, dessen Monomere über zwei intermolekulare Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Jing und Trowbridge, 1987). Das Monomer hat eine molekulare Masse von 85 kDa und enthält 760 Aminosäurereste (McClelland *et al.*, 1984; Schneider *et al.*, 1984). Der N-Terminus (61 Aminosäurereste) liegt intrazellulär, der C-Terminus (671 Aminosäurereste) in Form einer großen Domäne extrazellulär vor. Die Transmembrandomäne wird durch 28 Aminosäurereste gebildet (Trowbridge und Omary, 1981; Schneider *et al.*, 1984). Die große, extrazelluläre Domäne ist mehrfach glykosyliert (Omary und Trowbridge, 1981; Hayes *et al.*, 1992). Jedes Monomer kann ein mit ein oder zwei Eisenionen beladenes Transferrinmolekül binden. Auf die Bindung folgt die Clathrin- und AP-2 (*adaptor protein 2*)-vermittelte Endozytose. Im Endosom wird der pH-Wert zelltypabhängig auf ca. pH5,6 gesenkt. Während sich die Eisenionen unter diesen Bedingungen vom Transferrin lösen und durch das Transporterprotein DMT1 (*divalent metal transporter 1*) in das Zytoplasma transportiert werden (Fleming *et al.*, 1998), bleibt das Transferrinmolekül am Rezeptor gebunden und wird mit diesem zusammen zurück an die Zelloberfläche transportiert. Erst dort löst sich Transferrin vom Rezeptor. Der gesamte Zyklus ist innerhalb von Minuten abgeschlossen (Aisen, 2004). Alle proliferierenden Zelltypen präsentieren den Transferrinrezeptor an ihrer Oberfläche (Trowbridge und Omary, 1981), wobei die Wachstumsphase Einfluss auf die Menge an Rezeptormolekülen an der Zelloberfläche hat (Larrick und Cresswell, 1979). An CHO-Zellen, in denen das Gen für den Transferrinrezeptor mutiert wurde (McGraw *et al.*, 1987), konnte gezeigt werden, dass die Zellen neben der rezeptorabhängigen Aufnahme Eisen auch unspezifisch aufnehmen können (Chan *et al.*, 1992). Aufgrund seiner effizienten Internalisierung und seines Vorkommens auf allen möglichen Zelltypen eignet sich der Transferrinrezeptor sehr gut als Antigen für den scFv-Teil des Fusionsproteins, um das *Ligand Sneaking*-Konzept zu testen.

### 1.3.2 Das *Pseudomonas* Exotoxin A

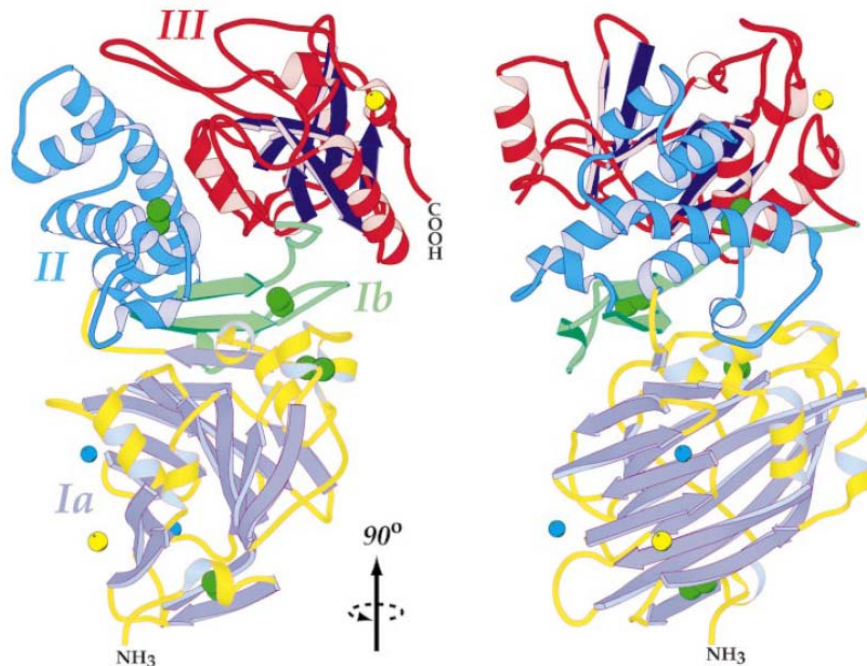
Ein besonders kritischer Schritt innerhalb des *Ligand Sneaking*-Konzeptes ist die Überwindung der Membran beim Übertritt des Effektormoleküls aus dem Endosom in das Zytoplasma. Membranen stellen im Normalfall unüberwindliche Barrieren für lösliche Proteine, z. B. aus dem Serum, dar (Alberts *et al.*, 2008; van Meer *et al.*, 2008). Einige bakterielle Toxine enthalten jedoch Protein-domänen, mit denen sie die Membran eines Endosoms überwinden können, so z. B. das *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA).

Die Polypeptidkette des 66 kDa großen ETA-Moleküls (Abb. 1.3-3) enthält 613 Aminosäurereste (ohne N-terminales Sekretionssignalpeptid). Das Protein lässt sich in drei Domänen unterteilen (Allured *et al.*, 1986), die jeweils eine spezifische Funktion tragen (Hwang *et al.*, 1987). Domäne I wird unterteilt in die Domänen Ia und Ib (Aminosäurereste 1 – 252 bzw. 365 – 404) und ist für die Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor, den alpha2-Makroglobulin-Rezeptor verantwortlich (Kounnas *et al.*, 1992), wodurch das Toxin endozytotisch von der Wirtszelle aufgenommen wird. Die Domäne II (Aminosäurereste 253 – 364) ist verantwortlich für die Translokation eines 37 kDa großen, C-terminalen Abschnitts des Toxins in das Zytoplasma der Zielzelle (Ogata *et al.*, 1990). Die dritte Domäne (Aminosäurereste 365 – 613) katalysiert den toxischen Effekt, nämlich die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors eEF2, wodurch die Proteinsynthese der Wirtszelle zum Erliegen kommt (Hwang *et al.*, 1987; Chaudhary *et al.*, 1990b).

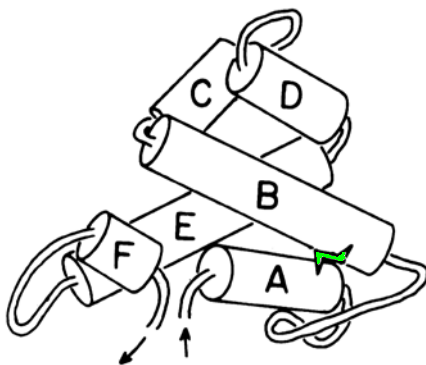
Das *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsprotein macht sich den Translokationsmechanismus des ETA-Moleküls zunutze. Die Domäne ETA II vermittelt den Membrandurchtritt (Abb. 1.5-1). Sie ist aus sechs alpha-helicalen Abschnitten aufgebaut (Helices A – F) und enthält eine intramolekulare Disulfidbrücke, welche die Helices A und B miteinander verknüpft (Cys265 und Cys287). Nach der rezeptorvermittelten Endozytose ist die ATP-abhängige Ansäuerung endosomalen Milieus auf pH5,6 Voraussetzung für eine erfolgreiche Translokation (Taupiac *et al.*, 1996; Alami *et al.*, 1998). Das Molekül wird im Endosom durch die Protease Furin gespalten (Chiron *et al.*, 1994; Chiron *et al.*, 1997), was zwischen den Aminosäureresten Arg279 und Gly280 geschieht (Ogata *et al.*, 1992). Die Disulfidbrücke zwischen den Helices A und B, welche die beiden Fragmente verbindet, wird schließlich durch Reduktion gespalten. Dafür muss das Molekül partiell entfaltet werden (McKee und FitzGerald, 1999). Anschließend tritt ein 37 kDa großes, C-terminales Fragment, das die toxische Domäne ETA III beinhaltet, in das Zytoplasma über (Ogata *et al.*, 1990).

Der genaue Translokationsmechanismus ist nicht geklärt. Im Gegensatz zu anderen bakteriellen Toxinen wie dem Diphtheria- oder Clostridium-Toxin enthält das *Pseudomonas* Exotoxin A keine hydrophoben Helices, mit denen es sich in die Membran einlagern könnte (Parker und Pattus, 1993; Lacy und Stevens, 1999). Hypothesen gehen entweder von einer Translokation in das Zytoplasma direkt aus dem Endosom oder aber einer Nutzung des retrograden Transportweges aus dem Endosom in das Endoplasmatische Retikulum und einer Translokation aus diesem Kompartiment aus. In Modellsystemen konnte gezeigt werden, dass das ETA-Molekül sich in künstliche Membranen einlagern kann (Jiang und London, 1990; Rasper und Merrill, 1994).

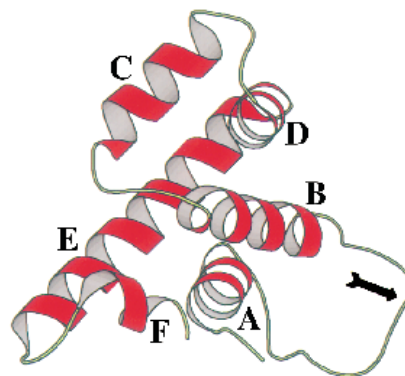
### A) Struktur des *Pseudomonas* Exotoxin A



### B) Bändermodell ETA II (1)



### C) Bändermodell ETA II (2)



### Abb. 1.3-3: Struktur des *Pseudomonas* Exotoxin A

**A) Bändermodell des *Pseudomonas* Exotoxin A** (aus: Wedekind *et al.*, 2001) Domäne Ia ist gelb, Domäne Ib grün, Domäne II blau und Domäne III rot eingefärbt. Blaue Kugeln stellen Natrium-Ionen, gelbe Kugeln Chlorid-Ionen in der Kristallstruktur dar. Grüne Kugeln bezeichnen die Positionen der Schwefelatome in Disulfidbrücken. **B) Bändermodell der Domäne ETA II** (aus: Allured *et al.*, 1986). Die einzelnen alpha-Helices der Domäne II sind mit Buchstaben bezeichnet (A – F). Grün eingefärbt ist die intramolekulare Disulfidbrücke, welche die Helices A und B verknüpft. **C) Bändermodell der Domäne ETA II** (aus: Taupiac *et al.*, 1999). Die einzelnen alpha-Helices der Domäne II sind mit Buchstaben bezeichnet (A – F). Der Pfeil bezeichnet die Stelle, an der die Domäne im Endosom proteolytisch gespalten wird.

Durch strukturelle Untersuchungen und Vergleich unterschiedlicher Mutanten konnte der Aminosäurerest Trp305 als Membrananker identifiziert werden, der bei der Ansäuerung des

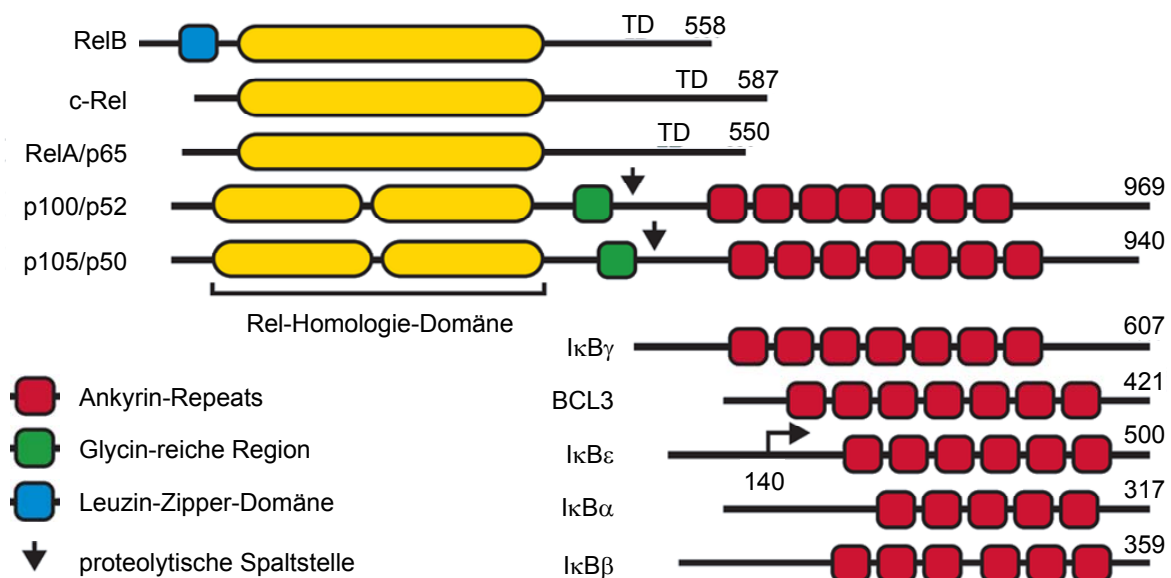
umgebenden Milieus durch eine strukturelle Veränderung aufgrund der Protonierung des Aminosäurerestes Asp358 freigelegt wird und die Membraninsertion einleitet (Mere *et al.*, 2005). An isolierten Endosomen konnte die direkte Translokation aus dem Endosom gezeigt werden (Alami *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite deuten andere Daten auf eine Verbindung zwischen der Translokation und dem retrograden Proteintransport aus dem Golgi-Apparat in das Zytoplasma hin. Es konnte die Abhängigkeit der Zytotoxizität von einer spezifischen, den C-Terminus des Toxins bildenden Aminosäuresequenz (-REDLK) gezeigt werden, der die Funktion eines ER-Retentionssignals zugeordnet werden konnte. Der Verlust an Zytotoxizität konnte auf eine fehlende Translokationsfähigkeit zurückgeführt werden (Chaudhary *et al.*, 1990a). Wurde die native C-terminale Sequenz durch die ER-Retentionssequenz KDEL (Munro und Pelham, 1987) ersetzt, stieg die Zytotoxizität um das bis zu neunfache (Seetharam *et al.*, 1991). ETA kann *in vitro* mit isolierten KDEL-Rezeptoren interagieren (Kreitman und Pastan, 1995). Zellen, in denen die KDEL-Rezeptoren kompetitiv blockiert wurden, und Zellen, in denen der Transport des KDEL-Rezeptors vom Golgi-Apparat zum ER durch injizierte Antikörper unterbunden wurde, verloren ihre Sensitivität gegenüber ETA, wohingegen die Sensitivität von Zellen bei einer Überexpression von KDEL-Rezeptoren anstieg (Jackson *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Der Transkriptionsfaktor NF-kappaB

Der Name NF-kappaB (*nuclear factor kappaB*) bezieht sich auf eine Gruppe von dimeren Säugetier-Transkriptionsfaktoren, die aus einer Gruppe von fünf Proteinen gebildet werden. Allen ist eine konservierte Region, die sog. Rel-Homologie-Domäne (RHD) gemein (Abb. 1.3-4). Die RHD enthält sowohl die für die DNS-Bindung als auch die für die Dimerisierung verantwortlichen Sequenzen. Zusätzlich enthält sie auch ein nukleäres Translokationssignal, mit dessen Hilfe der in seiner inaktiven Form im Zytoplasma vorliegende dimere Transkriptionsfaktor in den Zellkern transportiert wird. Hier aktiviert das Dimer die Transkription von Genen, die im Promotor bzw. in *Enhancer*-Bereichen ein bestimmtes DNS-Sequenzmotiv, die kappaB-Box, beinhalten. Die fünf Proteine der NF-kappaB-Familie lassen sich in zwei Gruppen einordnen: Zur ersten Gruppe gehören die Proteine RelA/p65, RelB und c-Rel, die in ihrer aktiven Form synthetisiert werden. Nur die Mitglieder dieser Gruppe enthalten sog. Transaktivierende Domänen, die für eine Aktivierung der Zielgen-Transkription verantwortlich sind. Zur zweiten Gruppe gehören die Proteine NF-kappaB1/p105 und NF-kappaB2/p100, die als Vorläufer der Monomere p50 (aus p105) und p52 (aus p100) synthetisiert werden und erst einer Prozessierung bedürfen, um Teil des aktiven Dimers werden zu können (Schmitz *et al.*, 2004). Im Zuge der Prozessierung wird jeweils ungefähr die Hälfte des Vorläuferproteins C-terminal proteolytisch abgebaut. Dieser abgebaute Teil enthält jeweils sieben wiederholte strukturelle Motive, sog. Ankyrin-Repeats. Die Prozessierung von p105 zum aktiven Monomer p50 ist ein konstitutiver Prozess (Moorthy *et al.*, 2006), während die Prozessierung von p100 zu p52 reguliert wird (Amir *et al.*, 2004).



Heterodimere, die als Transkriptionsfaktoren aktiv sind, werden jeweils von einem Mitglied der ersten Gruppe mit einem prozessierten Mitglied der zweiten Gruppe gebildet, wobei das in der Zelle am häufigsten vorkommende Heterodimer p50/RelA ist. Es gibt aber auch p50/p50- bzw. p52/p52-Homodimere, welche die Transkription reprimieren (Schnitz und Baeuerle, 1991). Heterodimere, die RelA oder c-Rel enthalten, liegen im inaktiven Zustand im Zytoplasma vor, wo sie durch spezielle inhibitorische Proteine der I $\kappa$ B-Familie (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) komplexiert werden. Die I $\kappa$ B-Proteine zeichnen sich durch sechs oder sieben Ankyrin-Repeats aus, mit denen die Inhibitoren an die RHD der NF- $\kappa$ B-Proteine binden. Dadurch werden die Kernlokalisationssequenzen der NF- $\kappa$ B-Proteine maskiert und die Transkriptionsfaktoren an der Translokation in den Zellkern gehindert. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgt durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung des I $\kappa$ B-Proteins, gefolgt vom Abbau des Inhibitors im Proteasom. Daraufhin kann das freie Dimer in den Kern übertreten und seine Zielgene aktivieren (Karin und Ben-Neriah, 2000).

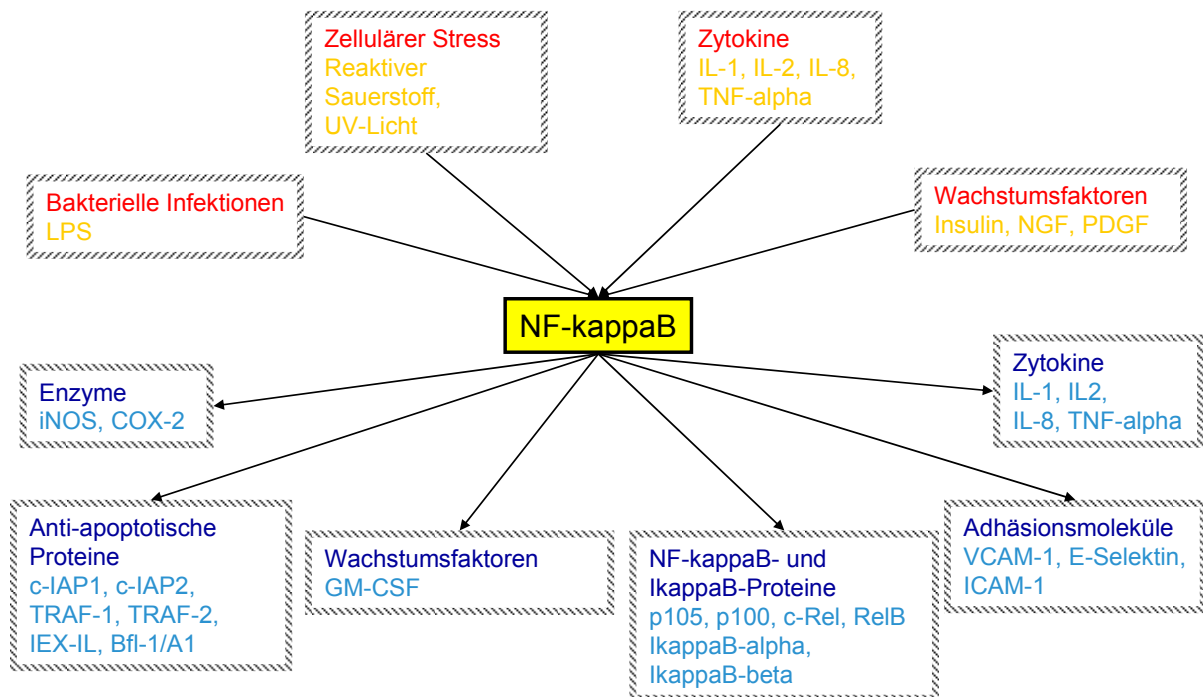


**Abb. 1.3-4: NF- $\kappa$ B- und I $\kappa$ B-Proteine (verändert aus: Voll und Hantschel, 2001)**

Schematische Darstellung der strukturellen und funktionalen Motive. Die Zahlen am rechten Ende der Proteindarstellung geben die Anzahl der Aminosäurereste des Proteins an. TD: Transaktivierende Domäne. Das Protein I $\kappa$ B $\epsilon$  hat einen alternativen Translationsstart bei Aminosäure Met140.

Die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren regulieren eine große Anzahl von Genen, die im Kontext von Entzündungsreaktionen, bei der Zellproliferation, bei anti-apoptotischen Prozessen und bei der Reaktion auf zellulären Stress von Bedeutung sind (Abb. 1.3-5). NF- $\kappa$ B stimuliert u. a. die Expression von Genen für Zytokine und Chemokine wie z. B. TNF-alpha (*tumour necrosis factor alpha*) (Kuprash *et al.*, 1995; Trede *et al.*, 1995), IL-1 beta (Interleukin 1-beta) (Hiscott *et al.*, 1993), IL-2 (Hoyos *et al.*, 1989) sowie IL-8 (Eckmann *et al.*, 1993) und CD40L (Schubert *et al.*, 2002). Auch Gene von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Schreck und Baeuerle, 1990) werden von ihnen kontrolliert. Ebenso unterliegt das Gen für das

Cyclin D1 direkt der Kontrolle durch NF-kappaB (Guttridge *et al.*, 1999). Anti-apoptotische Effekte werden durch die Kontrolle der Expression der Gene für c-IAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis*), c-IAP2, (Deveraux und Reed, 1999), TRAF1 (*TNF receptor-associated factor*), TRAF2 (Wang *et al.*, 1998), A1/Bfl-1 und IEX-IL (Wu *et al.*, 1998) vermittelt. Zusätzlich regulieren die Transkriptionsfaktoren auch ihre eigene Expression, indem Gene der NF-kappaB- und IkappaB-Familien reguliert werden, wie z. B. die Gene für IkappaB-alpha (Sun *et al.*, 1993), IkappaB-beta (Hertlein *et al.*, 2005), p105 (Ten *et al.*, 1992; Cogswell *et al.*, 1993), p100 (Liptay *et al.*, 1994), c-Rel (Hannink und Temin, 1990) und RelB (Ryseck *et al.*, 1992). Das Gen für RelA wird dagegen nicht durch NF-kappaB reguliert (Thompson *et al.*, 1995), es wird stattdessen auf einem hohen basalen Niveau exprimiert (Ruben *et al.*, 1991). Gene für Enzyme wie die Induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Appleby *et al.*, 1994; Kosaka *et al.*, 1994; Newton *et al.*, 1997) unterliegen der Kontrolle durch NF-kappaB genauso wie Gene für Zelladhäsionsmoleküle wie E-Selektin (Schindler und Baichwal, 1994), VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) (Boulianne *et al.*, 1984) und ICAM (*intercellular adhesion molecule*) (Wertheimer *et al.*, 1992). Diese Auswahl an Zielgenen ist bei weitem nicht vollständig.



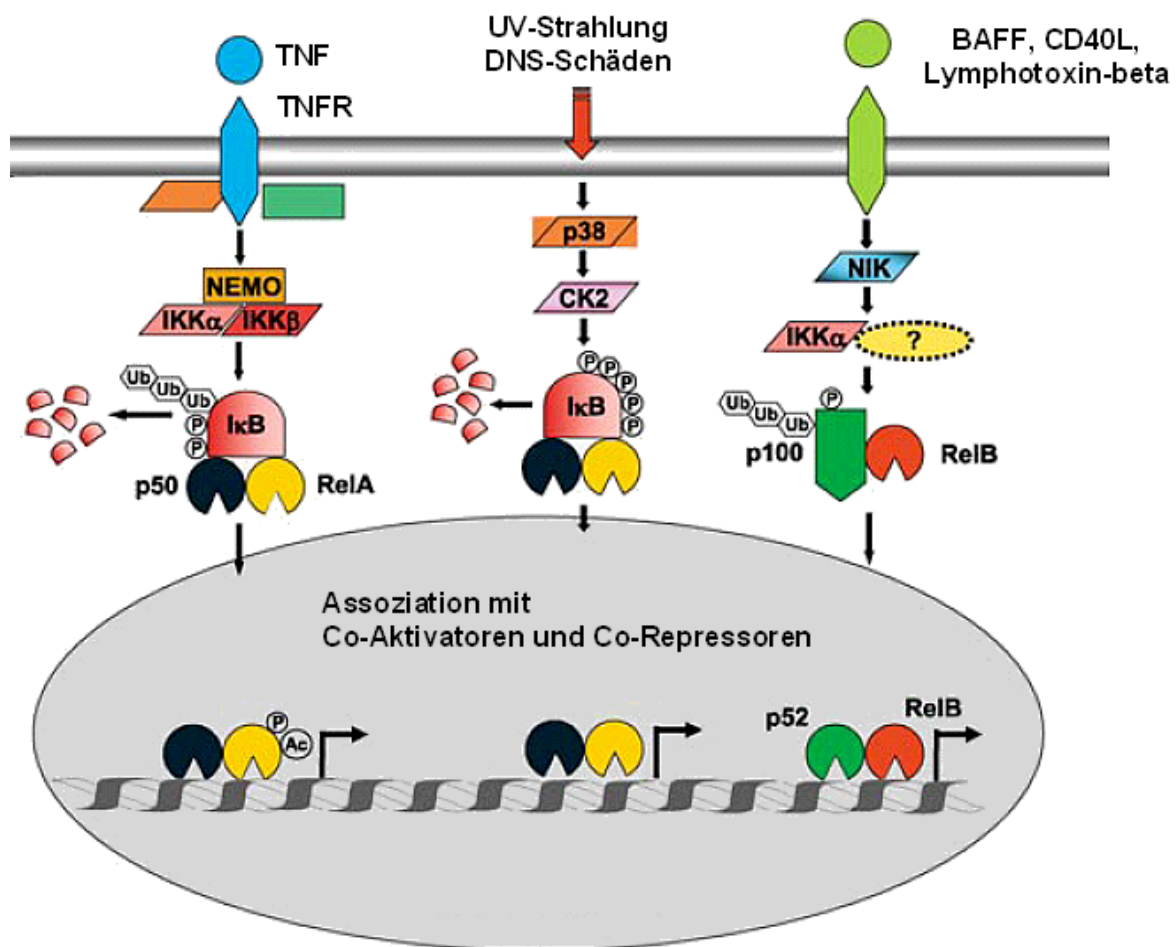
**Abb. 1.3-5: Aktivatoren und Zielgene von NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren**

Exemplarisch sind einige NF-kappaB-aktivierende Faktoren (rot/gelb) und Zielgene der Transkriptionsfaktoren (blau/hellblau) aufgelistet.

So breit wie das Spektrum der regulierten Gene ist auch das Spektrum der Signale, die eine Aktivierung der NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren auslösen, wobei einige Signale parakrin oder autokrin ihre eigene Verstärkung verursachen können (Abb. 1.3-5). So wirken Endotoxine bei einer bakteriellen Infektion (Zhang und Ghosh, 2001) und zelluläre Stressfaktoren wie DNS-Schäden nach UV-Bestrahlung (Bender *et al.*, 1998) sowie oxidativer Stress (Schreck *et al.*, 1992) als Aktivatoren.

Bestimmte Zytokine wie TNF-alpha (Collart *et al.*, 1990), IL-1beta (Shirakawa *et al.*, 1989), IL-2 (Cross *et al.*, 1989) und IL-8 (Kunsch und Rosen, 1993) aktivieren die Transkriptionsfaktoren genauso wie Wachstumsfaktoren wie Insulin (Bertrand *et al.*, 1995), PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Olashaw *et al.*, 1992) oder NGF (*neuronal growth factor*) (Carter *et al.*, 1996). In T-Zellen werden NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors aktiviert (Hazan *et al.*, 1990; Jamieson *et al.*, 1991).

Es sind bislang drei Wege bekannt, die zur Aktivierung unterschiedlicher NF-kappaB-Dimere führen (Abb. 1.3-6): der kanonische Weg, der nicht-kanonische (alternative) Weg und ein dritter Aktivierungsweg, der bei DNS-Beschädigung aktiviert wird (Schmitz *et al.*, 2004).



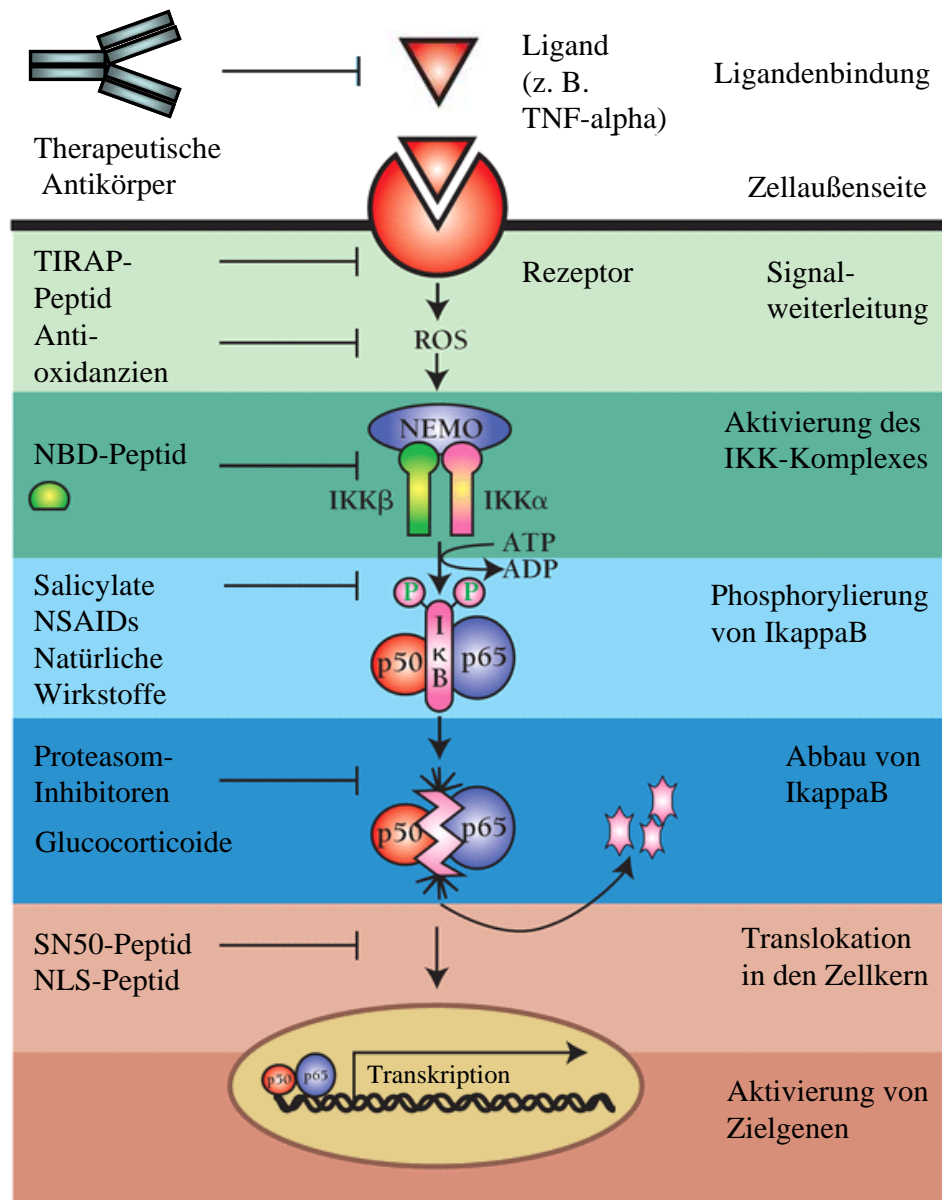
**Abb. 1.3-6: Drei Wege zur Aktivierung der NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren (verändert aus: Schmitz *et al.*, 2004)**

Beim Aktivierungsweg nach DNS-Beschädigung wird IkappaB-alpha in Abhängigkeit von einem Mechanismus phosphoryliert, der auf der Aktivität einer p38-MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) und der Kinase CK2 beruht. IkappaB-alpha wird daraufhin proteasomal abgebaut, was zur Freisetzung von NF-kappaB-Dimeren und deren Translokation in den Zellkern führt (Kato *et al.*, 2003).

Der nicht-kanonische Aktivierungsweg führt zur Bildung von freien p52/RelB-Dimeren. Einige Mitglieder der Familie der TNF-Proteine wie BAFF (*B-cell activating factor*) (Claudio *et al.*, 2002; Kayagaki *et al.*, 2002), CD40L (Coope *et al.*, 2002) und Lymphotoxin beta (Dejardin *et al.*, 2002) aktivieren durch Bindung ihres Rezeptors an der Zelloberfläche einen Mechanismus, bei dem die Proteinkinase NIK (*NF-kappaB inducing kinase*) die Kinase IKK-1/IKK-alpha (*IkappaB kinase 1/alpha*) aktiviert. Diese phosphoryliert das NF-kappaB-Protein p100, welches meist als Komplex mit RelB im Zytoplasma vorliegt und mit seinen Ankyrin-Repeats selbst die inhibitorische Funktion ausübt, die bei anderen Dimeren die IkappaB-Proteine übernehmen (Solan *et al.*, 2002). Nach der Phosphorylierung wird p100 durch das Proteasom zum p52 prozessiert. Die dadurch entstehenden p52/RelB-Dimere können in den Zellkern übertreten und ihre transkriptionsaktivierende Funktion ausüben (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Durch die Prozessierung von p100 kann es zur Freisetzung von RelB-Monomeren kommen, die mit freien p50-Monomeren zusätzlich auch aktive p50/RelB-Dimere bilden können (Muller und Siebenlist, 2003).

Der kanonische Aktivierungsweg aktiviert p52-Heterodimere und wird durch die meisten proinflammatorischen Zytokine aktiviert. Bei diesem Weg ist der sog. IKK-Komplex (*IkappaB kinase complex*) von zentraler Bedeutung, der durch Phosphorylierung der IkappaB-Proteine deren proteasomalen Abbau einleitet (Häcker und Karin, 2006). Dieser Komplex enthält die zwei Kinasen IKK-1/IKK-alpha und IKK-2/IKK-beta (DiDonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997) sowie eine regulatorische Untereinheit, die NEMO (*nuclear factor kappaB essential modulator*) oder IKK-gamma genannt wird (Rothwarf *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998). Die beiden Kinasen interagieren mit dem NEMO-Protein über die sog. *NEMO Binding domain* (NBD), eine Sequenz von sechs Aminosäuren am C-Terminus der Kinasen (May *et al.*, 2002). In Abhängigkeit von der Art des Stimulus führen vorgeschaltete Prozesse zur Phosphorylierung von IKK-2, woraufhin IKK-2 über die Phosphorylierung von IkappaB-Proteinen deren Abbau durch das Proteasom einleitet. Im Gegensatz zum nicht-kanonischen Weg spielt die Kinase IKK-1 beim kanonischen Weg keine katalytische Rolle (Delhase *et al.*, 1999).

Die NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren regulieren Gene, die im Zusammenhang mit ihrer eigenen Regulation, Immunreaktionen, Proliferation und anti-apoptotischen Effekten von Bedeutung sind. Eine breite Auswahl von Krankheitsbildern zeigt eine Fehlregulation der NF-kappaB-Aktivität, z. B. viele Krebsarten wie B- und T-Zell-Lymphome, Chronische Lymphozytische Leukämie (CLL), Brustkrebs und andere Karzinome (Karin *et al.*, 2002; Lin und Karin, 2003). In Krebszellen, in denen über TNF-alpha Apoptose ausgelöst werden soll, blockiert eine hohe NF-kappaB-Aktivität die Auslösung des programmierten Zelltods (Beg und Baltimore, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Auch die Wirkung von Chemo- und Strahlentherapie wird durch hohe NF-kappaB-Aktivität eingeschränkt (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999). Die durch NF-kappaB regulierten Gene sind auch im Zusammenhang mit der Neoangiogenese bei der Onkogenese von Bedeutung (Koch *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000). Ebenso tritt bei inflammatorischen Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Asthma, Psoriasis (Schuppenflechte) und rheumatoider Arthritis eine erhöhte NF-kappaB-Aktivität auf (Li und Verma, 2002).



**Abb. 1.3-7: Möglichkeiten zur Unterbrechung des NF-kappaB-Signaltransduktionsweges (verändert aus: D'Acquisto *et al.*, 2002)**

Schematisch dargestellt sind Ereignisstufen, die zur Translokation des p65/p50-Heterodimers in den Kern mit anschließender Aktivierung von Zielgenen führen (rechts). Dem gegenübergestellt sind Substanzen, welche auf den unterschiedlichen Stufen zur Unterbrechung des Signaltransduktionsweges führen können (links).

Vor diesem Hintergrund wurden bereits eine Reihe von Wirkstoffen erforscht (Abb. 1.3-7), welche in den Aktivierungsweg von NF-kappaB eingreifen (Yamamoto und Gaynor, 2001; D'Acquisto *et al.*, 2002). Salicylate inhibieren die Bindung von ATP an die Kinasedomäne von IKK-2 (Yin *et al.*, 1998). NSAIDs (*Non-steroidal anti-inflammatory drugs*) wie Ibuprofen und Sulindac senken die NF-kappaB-Aktivität ebenfalls durch Inhibition der Kinase IKK-2 (Lo *et al.*, 1998; Scheuren *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999). Der gleiche Mechanismus liegt der Wirkung von natürlichen Wirkstoffen wie Curcumin aus der Gelbwurz (Kumar *et al.*, 1998; Jobin *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000), Capsaicin aus dem Roten

Pfeffer (Surh *et al.*, 2000) und Resveratrol, einem Polyphenol aus dem Roten Wein (Blanco-Colio *et al.*, 2000; Holmes-McNary und Baldwin, 2000), zugrunde.

Glucocorticoide erhöhen die Expression von I $\kappa$ B- $\alpha$  und verstärken damit die Retention der NF- $\kappa$ B-Dimere im Zytoplasma (Auphan *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995). Auch Inhibitoren des Proteasoms verstärken die Retention (Palombella *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2000). Antioxidanzien fangen reaktive Sauerstoffspezies ab, die eine Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B spielen (Weber *et al.*, 1994). Therapeutische Antikörper wie Humira oder Remicade binden an Liganden wie TNF- $\alpha$  und verhindern die Bindung an ihren Rezeptor, der die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion aktivieren würde (Schrama *et al.*, 2006).

Es wurden mehrere Peptide entwickelt, die auf unterschiedlichen Stufen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs wirken. Dafür wurde jeweils ein peptidischer Effektor mit einem unspezifisch membrangängigen Peptid fusioniert, um den Effektor in das Zytoplasma von Zellen einzuschleusen. Das sog. TIRAP-Peptid besteht aus einem Penetratin-Peptid (Derossi *et al.*, 1998) und einer Sequenz aus dem Protein TIRAP (*Toll-interleukin 1 receptor-domain-containing adaptor protein*), mit dem das Protein an TLR4 (*Toll-like receptor 4*) bindet. Das Peptid blockiert die Interaktion des TIRAP-Proteins mit TLR4 und unterbricht so die rezeptorvermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch bakterielles LPS (Horng *et al.*, 2001). Das sog. SN50-Peptid und das sog. NLS-Peptid greifen in die Translokation des NF- $\kappa$ B-Dimers in den Zellkern ein. Das SN50-Peptid enthält die Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localisation sequence*) des p50-Proteins und konkurriert damit um die Importfaktoren, die am Kerntransport beteiligt sind (Lin *et al.*, 1995; Kolenko *et al.*, 1999; Koullich *et al.*, 2001). Den gleichen Mechanismus nutzt das NLS-Peptid. Es besteht aus zwei NLS-Abschnitten, welche die zellpenetrierende Peptidsequenz aus dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor flankieren und aus D-Aminosäuren synthetisiert wurden, um proteolytischen Abbau zu verhindern (Fujihara *et al.*, 2000).

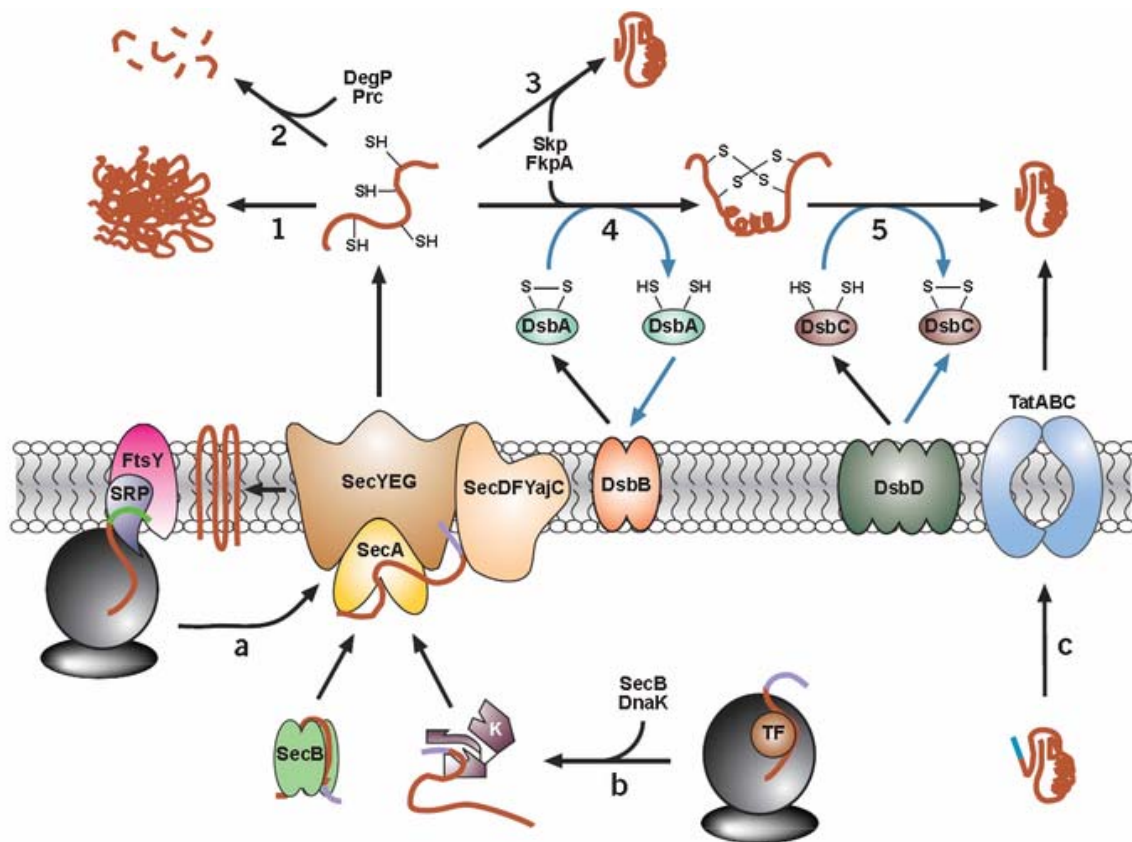
Ein weiteres Peptid mit der Fähigkeit, die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges zu unterbrechen, stellt das NBD-Peptid dar (Strickland und Ghosh, 2006). Die *NEMO binding domain* (NBD) ist das essentielle, C-terminale Motiv aus einer Sequenz von sechs Aminosäuren, mit dem IKK-1 (Aminosäuren 738 – 743: DWSWT) und IKK-2 (Aminosäuren 737 – 742: DWSWL) an die regulatorische Untereinheit NEMO im IKK-Komplex binden. Die beiden Tryptophanreste sind essentiell für die Funktion der NBD-Region. Beim Austausch durch Alanine verlieren die NBDs ihre Funktionsfähigkeit. Im NBD-Peptid wurde die NBD aus der Kinase IKK-2 mit einem zellpenetrierenden Antennapedia-Peptid fusioniert und verhindert durch kompetitive Bindung an NEMO erfolgreich die Bildung des IKK-Komplexes (May *et al.*, 2000). Das Peptid konnte in einem inflammatorischen Maus-Modell die Entzündungssymptome signifikant mildern (di Meglio *et al.*, 2005). Auch mit einer Peptid-Variante, dem TAT-NBD-Peptid, welches statt der Antennapedia-Sequenz ein zellpenetrierendes Peptid aus dem HIV1 TAT-Protein enthält, konnte *in vitro* und *in vivo* eine Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivität und eine wirksame Bekämpfung von Entzündungssymptomen nachgewiesen werden (Choi *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2004).



Das Prinzip, welches der Wirkung des NBD-Peptids und des TAT-NBD-Peptids zugrunde liegt, soll im Rahmen des *Ligand Sneaking*-Konzeptes zur Unterbrechung des NF-kappaB-Signalweges genutzt werden. NBD bildet das Effektmolekül, welches mit Hilfe des *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteins in das Zytoplasma von Zellen eingeschleust werden soll.

## 1.4 Sekretion von Proteinen in *E. coli*

Bei der sekretorischen Produktion von Proteinen in *E. coli* wird das Protein in das Periplasma geschleust, in dessen oxidativem Milieu die Faltung und die Ausbildung von Disulfidbrücken stattfinden kann (Abb. 1.4-1).



**Abb. 1.4-1: Proteinexport und -faltung in *Escherichia coli* (aus: Baneyx und Mujacic, 2004)**

Grünes Signalpeptid: hochgradig unpolarer Charakter, die Proteine werden über den SRP-Transportweg ausgeschleust (a). Violetter Signalpeptid: moderat unpolarer Charakter, die Proteine werden über den Sec-Transportweg ausgeschleust (b). Türkises Signalpeptid: Signalpeptid mit *twin arginine*-Motiv, die Proteine werden über den Tat-Transportweg ausgeschleust (c). Sekretierte Proteine können während des Faltungsvorgangs aggregieren (1), proteolytisch abgebaut werden (2) oder – u. U. mit Hilfe von Chaperonen – ihre native Faltung einnehmen (3). Cystein-Thiolgruppen werden durch DsbA zu Disulfidbrücken oxidiert (4). DsbC isomerisiert bereits gebildete Disulfidbrücken (5). Schwarze Pfeile: Transport- bzw. Umwandlungsschritt. Blaue Pfeile: Elektronenfluss.

In Abhängigkeit vom N-terminalen Signalpeptid wird das Protein entweder über den Sec (*secretion*)-Transportweg, den SRP (*signal recognition particle*)-Transportweg oder den Tat (*twin arginine*

*translocation*)-Transportweg aus dem Zytoplasma in das Periplasma transportiert. Über den Tat-Transportweg werden vollständig gefaltete Proteine sekretiert. Die meisten von *E. coli* sekretierten Proteine werden jedoch über den Sec-Transportweg exportiert. Dabei bindet das bakterielle, zytoplasmatische Chaperon SecB an die wachsende Polypeptidkette kurz nach dem Verlassen des Ribosoms und erhält den ungefalteten Status des Proteins. SecB liefert die Polypeptidkette an das Protein SecA, welches unter Hydrolyse von ATP und unter Mitwirkung des SecDFYajC-Komplexes das Protein durch den membranständigen SecYEG-Komplex in das Periplasma transportiert, wobei das N-terminale Signalpeptid proteolytisch abgespalten wird. Auch der SRP-Transportweg nutzt den SecYEG-Komplex zum Export. Das bakterielle Protein Ffh und eine kleine RNS-Einheit bilden den SRP-Komplex, der an bestimmte Signalpeptide oder Transmembrandomänen von internen Membranproteinen bindet und den Komplex aus SRP, wachsender Polypeptidkette und Ribosomen an den membranständigen Rezeptor FtsY koppelt. Dort zerfällt der Komplex unter GTP-Hydrolyse, wobei die wachsende Polypeptidkette in Abhängigkeit von SecA und dem SecDFYajC-Komplex kotranslatorisch durch den SecYEG-Komplex ausgeschleust wird (Berks *et al.*, 2000; Baneyx und Mujacic, 2004; Wickner und Schekman, 2005). Die Faltung im Periplasma wird durch Chaperone der Dsb-Familie unterstützt (Kadokura *et al.*, 2003; Messens und Collet, 2006).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit (Broders, 2004) wurden Genkonstrukte für *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteine in unterschiedlichen Expressionvektoren kloniert, die eine Produktion durch Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum von *Escherichia coli* erlauben, indem das Zielprotein mit einem N-terminalen PelB-Signalpeptid produziert wird. Die Konstrukte beinhalten hinter dem Signalpeptid einen N-terminalen Strep-Tag II, gefolgt von einem 6xHis-Tag. Im Anschluss an die Genfragmente der Tags wurde das Genfragment des anti-CD71 scFv-Klons IQ111-2 kloniert und mit dem Genfragment der Translokationsdomäne aus dem *Pseudomonas* Exotoxin A (Aminosäuren 252 – 366 des reifen Toxins) fusioniert. In dieses Ausgangskonstrukt wurden drei Varianten des NBD-Peptids aus der humanen IKK-2 kloniert: Das Konstrukt LS5-NBDsII enthält die Aminosäuren 735 – 745, das Konstrukt LS6-NBDsII die Aminosäuren 707 – 756 und das Konstrukt LS7-NBDsII die Aminosäuren 644 – 756. Diese Fusionsproteine enthalten am C-Terminus ein ER-Retentionssignal (-KDEL), da dieses für die Translokationsfunktion der ETA II-Domäne notwendig ist (Chaudhary *et al.*, 1990a; Seetharam *et al.*, 1991). Das scFv-Antikörperfragment und die ETA II-Domäne wurden über eine sieben Aminosäurereste lange *Linker*-Sequenz (-GGGSGGG-) sowie ETA II-Domäne und NBD über eine zehn Aminosäurereste lange *Linker*-Sequenz (-SGGGSGGGGS-) verbunden (Broders, 2004).

Die Konstrukte wurden produziert und über den Strep-Tag II aufgereinigt, da eine Aufreinigung über den 6xHis-Tag zu unbefriedigenden Ergebnissen führte. Es konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass die Fusionsproteine im Gegensatz zum Antikörper allein ins Zytoplasma von HeLa-Zellen translozieren. Die Translokation des Fusionsproteins konnte durch Nigericin, einer Substanz,



welche die Ansäuerung der Endosomen verhindert, unterbunden werden. Eine Reduktion der NF-kappaB-Aktivität konnte in einem zellbasierten Reporterassay zwar gemessen werden, die Ergebnisse waren aber statistisch nicht signifikant (Broders, 2004).

Das Hauptproblem lag an der geringen Menge an funktionellem, reinem Zielprotein, welches durch die Sekretion ins Periplasma von *E. coli* produziert werden konnte. Es war nicht möglich, größere Mengen des Proteins LS7-NBDsII ohne das ER-Retentionssignal KDEL am C-Terminus durch Sekretion ins Medium mit Mammalia-Zellen (Dr. Thomas Jostock, persönliche Mitteilung) oder mit der Hefe *Pichia pastoris* (Dr. Christian Menzel, persönliche Mitteilung) zu produzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine Strategie für die Produktion von funktionellen *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteinen entworfen werden. Dazu sollten unterschiedliche Produktionsmethoden auf ihre Eignung überprüft werden. Im *E. coli*-System sollte eine Reihe von Varianten des ursprünglichen *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins LS7-NBDsII kloniert und produziert werden, um die Ursache für die geringe Ausbeute bei der Produktion durch Sekretion ins Periplasma zu untersuchen. Neben der Produktion in *E. coli* sollte auch ein weiteres eukaryotisches Produktionssystem, die Baculovirus-basierte Produktion in Insektenzellen, getestet werden. Das mit den unterschiedlichen Methoden produzierte Protein sollte hinsichtlich der Ausbeute, des Erfolgs bei der Aufreinigung, der Antigenspezifität und bezüglich der Fähigkeit zur Unterbrechung des NF-kappaB-Signalweges in einem zellbasierten Reporterassay bewertet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Dialyseschläuche   | Roth; Serva               |
| Elektroporationsküvetten (für Gene Pulser)                         | BioRad                    |
| Impfösen (10 µl und 1 µl)  | VWR International         |
| Mikrotiterplatten Falcon   | Falcon                    |
| Mikrotiterplatten Nunc „Maxisorb“                                  | Nunc                      |
| Nitrozellulosemembran  | Amersham                  |
| PCR-Reaktionsgefäße  | Greiner Bio-one; Sarstedt |
| Petrischalen   | Greiner Bio-one           |
| Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)                                       | Greiner Bio-one           |
| Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)                               | Greiner Bio-one           |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)                                     | Sarstedt                  |
| Schraubröhren (2 ml )  | Sarstedt                  |
| Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)                           | Sarstedt                  |
| Pipettenspitzen (5000 µl)  | Eppendorf; Gilson         |
| Zellkultur- und Mikrotiterplatten (10 cm, 6Well, 24Well, 96Well)   | Greiner Bio-one           |
| PVDF-Membran   | Roth                      |
| Celluloseacetat-Filter   | Sartorius                 |
| Ultrafiltrationsmembran  | Amicon                    |
| Filterpapier   | Schleicher-Schüll         |
| Polyallomer Centrifuge Tubes 9/16 x 3 ½ inch (für Ultrazentrifuge) | Beckman Coulter           |

#### 2.1.2 Laborausstattung

|                        |                                     |               |
|------------------------|-------------------------------------|---------------|
| FPLC-Anlagen           | ÄKTAPrime                           | GE Healthcare |
|                        | ÄKTAPurifier                        | GE Healthcare |
| Western Blot-Apparatur | TransBlot SD SemiDry Transfer Cell  | BioRad        |
| Elektroporatoren       | Mikropulser                         | BioRad        |
| Elektrophorese-Anlagen | Biotechnologie Model 40-0708 (DNS)  | PeQLab        |
|                        | BioRad Mini Protean III (SDS PAGE ) | BioRad        |

|                                 |                                 |                         |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 96Well-Platten-Waschgerät       | Columbus                        | Tecan                   |
| 96Well-Platten-Auswerter        | ELISA-Reader "SUNRISE"          | Tecan                   |
|                                 | Tecan ULTRA                     | Tecan                   |
| Filtrationseinheit              | Nalge                           | Nunc                    |
| Gel-Dokumentation               | Gel Jet Imager                  | Intas                   |
| Mikroskope                      | Axiovert 135TV                  | Zeiss                   |
|                                 | Diavert                         | Leitz                   |
| Heizblock                       | Thermomixer comfort             | Eppendorf               |
| Inkubatoren                     | Certomat-BS1                    | Infors AG               |
|                                 | Hera Cell                       | Heraeus                 |
|                                 | Brutschrank Modell 100-800      | Memmert                 |
| Mikrotiterplatteninkubator      | Thermo Shaker PST-60H-4         | Lab4you                 |
| Photometer                      | Nano-Drop ND – 1000             | NanoDrop Technologies   |
|                                 | Photometer Libra S 11           | Biochrom                |
|                                 | Ultrospec 3300 pro              | GE Healthcare           |
| Sequenziergerät                 | ABI Prism 310 Genetic Analyzer  | P.E. Applied Biosystems |
| Sterilbänke                     | Sterilbank LaminAir HLB 2472    | Heraeus                 |
|                                 | Hera Safe                       | Heraeus                 |
| PCR-Geräte                      | Thermocycler PTC-150 Minicycler | MJ Research             |
|                                 | PTC-200 Minicycler              | MJ Research             |
| Waagen                          | analytic, 1205MP                | Sartorius               |
| Tischwippen                     | Wippen GFL 3013                 | Omnilab                 |
|                                 | Rocky, RT-1S                    | Labortechnik Fröbel     |
| Zentrifugen                     | Zentrifuge 5415 D               | Eppendorf               |
|                                 | Zentrifuge 5810R                | Eppendorf               |
|                                 | Multifuge 3 S-R                 | Heraeus                 |
|                                 | Sorval RC5B Plus                | Kendro                  |
|                                 | Sorval RC6 Plus                 | Kendro                  |
| Durchflusszytometer             | FC500                           | Beckman Coulter         |
| Überkopfschüttler               | Rotator                         | Gkisker                 |
| pH-Meter                        | CG810                           | Schott                  |
| Bioreaktor                      | Minifors                        | Infors AG               |
| Schüttler (Insektenzellkultur)  | Certomat S II (50 mm Orbital)   | Sartorius               |
| Ultraschall-Zellaufschlussgerät | Sonoplus (Generator HD2200)     | Bandelin                |
| Mixer                           | VortexGenie2                    | Scientific Industries   |
| Ultrazentrifuge                 | Beckman L8-70M                  | Beckman                 |
| Rotor Ultrazentrifuge           | SW41 Ti                         | Beckman                 |

### 2.1.3 Chromatographie-Matrices und -Säulen

| Säule/Matrix                 | Anwendung     | Hersteller    |
|------------------------------|---------------|---------------|
| HisTrap 1 ml                 | IMAC          | GE Healthcare |
| Superdex75 HiLoad16/60       | Gelfiltration | GE Healthcare |
| Superdex75 HiLoad10/300      | Gelfiltration | GE Healthcare |
| Superdex200 HiLoad16/60      | Gelfiltration | GE Healthcare |
| Superdex200 HiLoad10/300     | Gelfiltration | GE Healthcare |
| HiTrap Desalting 5 ml        | Umpufferung   | GE Healthcare |
| Chelating Sepharose FastFlow | IMAC-Matrix   | GE Healthcare |

### 2.1.4 Bakterienstämme

#### ***Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, NL):**

F':Tn10(Tet<sup>r</sup>) proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) glnV44 relA1 lac

Dieser K12-Stamm wurde für die Klonierung von Expressionsvektoren, die Produktion von rekombinanten Proteinen und das Phagendisplay verwendet.

#### ***Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA):**

[F' lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>r</sup>)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

Dieser K12-Stamm wurde für die Klonierung von Expressionsvektoren verwendet.

#### ***Escherichia coli* DH10-Bac (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA):**

F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG/bMON14272/pMON7124

Dieser Stamm wurde für die Generierung von rekombinanten Baculovirus-Partikeln verwendet. Das Bacmid bMON14272 enthält das Virusgenom, in welches mittels der auf dem Plasmid pMON7124 codierten Transposasen das Zielgen aus einem Donorvektor (z.B. pFastBac1) in das Virusgenom ortsspezifisch integriert wird.

#### ***Escherichia coli* BLR(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA):**

F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet<sup>R</sup>)

Dieser B-Stamm (eine recA-Mutante von Stamm BL21) ist für zwei Proteasen (*lon* und *ompT*) defizient. Er wurde für die zytoplasmatische Expression von Zielgenen zur Produktion von bakteriellen *Inclusion bodies* verwendet. Er enthält auf dem λDE3-Lysogen das IPTG-induzierbare Gen für die T7 RNA Polymerase für die Expression von Genen von pET-Vektoren.

#### ***Escherichia coli* Origami(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA):**

Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)

Dieser K12-Stamm trägt Mutationen in den Genen der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und der Glutathion-Reduktase (*gor*), wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma ermöglicht wird. Er enthält auf dem  $\lambda$ DE3-Lysogen das IPTG-induzierbare Gen für die T7 RNA Polymerase für die Expression von Genen von pET-Vektoren. Der Stamm wurde für die zytoplasmatische Produktion von nativen Antikörperfusionsproteinen im Zytoplasma verwendet.

***Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA):**

$\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[\text{lac}^+ \text{lacI}^q \text{pro}] \text{gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam}^R, \text{Kan}^R, \text{Str}^R, \text{Tet}^R)$

Dieser Stamm stellt eine Weiterentwicklung des Origami(DE3)-Stammes dar. Er enthält auf dem pRARE-Plasmid die tRNS-Gene *argU*, *argW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tyrU* und *thrU*, wodurch die Transkription der seltenen Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA unterstützt wird. Er enthält auf dem  $\lambda$ DE3-Lysogen das IPTG-induzierbare Gen für die T7 RNA Polymerase für die Expression von Genen von pET-Vektoren. Der Stamm wurde für die zytoplasmatische Produktion von nativen Antikörperfusionsproteinen im Zytoplasma verwendet.

## 2.1.5 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Die Medienbestandteile wurden in Reinstwasser (Arium611-Anlage, Sartorius, Göttingen) gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert. Supplemente und Antibiotika wurden getrennt sterilisiert und bei Bedarf aus Stammlösungen dem Medium zugesetzt.

|                         |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| 2xYT-Flüssigmedium      | 16 g/l Trypton                   |
|                         | 10 g/l Hefeextrakt               |
|                         | 5 g/l NaCl                       |
| 2xYT-GA-Flüssigmedium   | 2xYT-Flüssigmedium mit Zusätzen: |
|                         | 100 mM Glucose                   |
|                         | 100 µg/ml Ampicillin             |
| 2xYT-AK-Flüssigmedium   | 2xYT-Flüssigmedium mit Zusätzen: |
|                         | 100 µg/ml Ampicillin             |
|                         | 50 µg/ml Kanamycin               |
| SOB(dKCl)-Flüssigmedium | 20 g/l Trypton                   |
|                         | 5 g/l Hefeextrakt                |
|                         | 0,5 g/l NaCl                     |

|                     |  |
|---------------------|--|
| SOC-Flüssigmedium   | SOB(dKCl)-Flüssigmedium mit Zusätzen:<br>20 mM MgCl <sub>2</sub><br>20 mM MgSO <sub>4</sub><br>20 mM Glucose               |
| Fermentationsmedium | 2xYT-Flüssigmedium (pH7,0) mit Zusätzen:<br>100 µg/ml Ampicillin<br>500 mM Sorbitol<br>100 mM Glucose<br>50 mM Na-Phosphat |
| Agar-Festmedium     | 15 g/L Agar in Flüssigmedium (ggf. mit Supplementen)   |

### 2.1.6 Bakteriophagen

**Hyperphage (Progen Biotechnik, Heidelberg)** (Rondot *et al.*, 2001)

Der Helferphage Hyperphage wurde für multivalentes Phagendisplay verwendet.

**M13K07 (GE Healthcare, München)** (Vieira und Messing, 1987)

Der Helferphage M13K07 wurde für monovalentes Phagendisplay verwendet.

### 2.1.7 Insektenzellen

Die verwendeten Insektenzelllinien wurden von Dr. Joop van den Heuvel, HZI, Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

Sf9                      Zelllinie, die aus dem Ovariengewebe des Puppenstadiums der Mottenart *Spodoptera frugiperda* entwickelt wurde.

Tn5 (HighFive)      Zelllinie (genaue Bezeichnung: BTI-Tn-5B1-4), die aus dem Ovariengewebe der Mottenart *Trichoplusia ni* entwickelt wurde.

### 2.1.8 Medien zur Kultivierung von Insektenzellen

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Sf9-Medium            | ExCell420 (JRH Biosciences) mit Zusätzen:<br>50 µg/ml Gentamicin<br>25 µg/ml Fungizon                |
| Tn5-Medium            | ExCell405 (JRH Biosciences) mit Zusätzen:<br>50 µg/ml Gentamicin<br>25 µg/ml Fungizon                |
| Plaque-Overlay-Medium | 75% (v/v) Sf-900 Medium (1,3x) (Gibco BRL)<br>25% (v/v) Low Melting Point-Agarose (4% (w/v), steril) |

### 2.1.9 Mammalia-Zelllinien

|            |   |
|------------|---|
| HeLa       | menschliche Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms<br>bezogen von: AG Dübel, TU Braunschweig  |
| MCF7       | menschliche Mammakarzinomzelllinie<br>bezogen von: Dr. Michaela Arndt, Universitätsklinikum Essen   |
| CHO-TRVb   | TFR-negative Variante einer Eierstockzelllinie des Chinesischen Hamsters (McGraw <i>et al.</i> , 1987)<br>bezogen von: Dr. Tim McGraw, Cornell University, New York, NY, USA  |
| CHO-TRVb-1 | TFR-negative Variante einer Eierstockzelllinie des Chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit dem menschlichen Gen für CD71 (McGraw <i>et al.</i> , 1987)<br>bezogen von: Dr. Tim McGraw, Cornell University, New York, NY, USA |
| HEK293T    | menschliche, embryonale Nierenzelllinie<br>bezogen von: AG Dübel, TU Braunschweig   |
| HEK293 Luc | menschliche, embryonale Nierenzelllinie, stabil transfiziert mit NF-kappaB-induzierbarem Luciferase-Reporterkonstrukt<br>bezogen von: Dr. Reinhard Voll, Universitätsklinikum Erlangen  |

### 2.1.10 Medien zur Kultivierung von Mammalia-Zellen

Fötales Kälberserum (FCS) wurde von Gibco/BRL, Eggenstein, bezogen. McCoy's 5A-Medium wurde von Biochrom AG, Berlin, alle anderen Medien und Zusätze von PAA Lab GmbH, Parsing, Österreich, bezogen.

|                   |   |
|-------------------|---|
| HeLa/MCF7-Medium  | DMEM (High Glucose) w/ L-Gln mit Zusätzen:<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin<br>10% (v/v) FCS<br>1% (v/v) L-Glutaminlösung (200 mM)<br>1% (v/v) Natriumpyruvatlösung<br>1% (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)                                     |
| HEK293T-Medium    | DMEM (High Glucose) w/ L-Gln mit Zusätzen:<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin<br>8% (v/v) FCS  |
| HEK293 Luc-Medium | DMEM (High Glucose) w/ L-Gln mit Zusätzen:<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin<br>10% (v/v) FCS<br>1% (v/v) L-Glutaminlösung (200 mM)<br>1% (v/v) Natriumpyruvatlösung<br>1% (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)<br>250 µg/ml Neomycin (G418-Sulfat) |
| CHO TRVb-Medium   | DMEM/Ham's F-12 w/ L-Gln mit Zusätzen:<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin<br>8% (v/v) FCS<br>250 µg/ml Neomycin (G418-Sulfat)  |
| CHO TRVb-1-Medium | McCoy's 5A w/ 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> w/o L-Gln mit Zusätzen:<br>1% (v/v) Penicillin/Streptomycin<br>5% (v/v) FCS<br>1% (v/v) L-Glutaminlösung (200 mM)<br>250 µg/ml Neomycin (G418-Sulfat)  |



### 2.1.11 Größenstandards für die Elektrophorese

| Name                       | Hersteller    | Anwendung        | Größenbereich   |
|----------------------------|---------------|------------------|-----------------|
| 1 kb DNA-Ladder            | MBI Fermentas | DNS-Agarose-Gele | 250 – 10.000 bp |
| Precision Plus Unstained   | Biorad        | SDS-PAGE         | 10 – 250 kDa    |
| Precision Plus Dual Colour | Biorad        | SDS-PAGE         | 10 – 250 kDa    |

### 2.1.12 Plasmide

| Plasmid                | Referenz / Bemerkung / bezogen von:                                   |
|------------------------|---|
| pOPE101 LS7-NBDsII     | Broders, 2004   |
| pHOG21 LS5-NBDsII      | Broders, 2004   |
| pOPE101 IQ111-2 scFv   | Iris Queitsch, Institut f. Molekulare Genetik, Universität Heidelberg |
| pICZalpha A aTFR scFv  | Christian Menzel, AG Dübel, TU Braunschweig                           |
| pFastBac1              | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA   |
| pFastBac Ig-cMet       | Dr. Joop van den Heuvel, HZI, Braunschweig                            |
| pOPE101 XP             | Laila Al-Halabi, AG Dübel, TU Braunschweig                            |
| pOPE101 215(yol)       | Kontermann <i>et al.</i> , 1995                                       |
| pET21a(+)              | Novagen, Madison, WI, USA   |
| pOPE101 IIB6 scFv      | Toleikis, 2003  |
| pHAL14 HT186-D11 scFv  | Holger Thie, AG Dübel, TU Braunschweig                                |
| pCMV HT186-D11 scFv-Fc | Holger Thie, AG Dübel, TU Braunschweig                                |
| pIT2                   | Phagemid der Tomlinson I+J scFv-Genbibliotheken                       |
| pHAL10                 | Dr. Michael Hust, AG Dübel, TU Braunschweig                           |
| pHAL14                 | Dr. Michael Hust, AG Dübel, TU Braunschweig                           |

### 2.1.13 Oligonukleotide

| Bezeichnung Oligonukleotid | Sequenz  |
|----------------------------|--|
| aTFR-VH/F1                 | TGCCTACATGGAACCTCAACAG                               |
| aTFR-VL/F1                 | AGACTGGTAGATGGGGTCCC                                 |
| aTFR-VL/R                  | TAGAGATGCATACATGGAAGATGG                             |
| BVO 01                     | GCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGG                        |
| BVO 02                     | AAATTCTAGATATATCCGGAACCGCCTCCTTTGATTCCAC             |
| BVO 03                     | TATATATCCGGAGGAGGTGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGC             |
| BVO 04                     | ATTATATCTAGATTATAGTTCGTCCTTGTGATGGTGGTGGTGGTGG<br>TG |
| BVO 08                     | TATAGCGGCCGCTGAACTGACTGTGAGAGTGGTGCC                 |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| BVO 13                   | GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG   |
| BVO 28                   | CCGGCCATGGCGGACATCAAGATGACCC  |
| BVO 29                   | TATACCCGGGGTCGTTGCCGGTGCCCTGCCGGACG   |
| BVO 30                   | AAATCCCGGGGACTCAGGAGGCGGTTGAGGGG  |
| BVO 31                   | CCGGCCATGGCGGTCCGGCTGCAGGAGAAGCGGC  |
| BVO 35                   | CCAGCTCCAGTCTAGGGCCG  |
| BVO 45                   | TATACATATGGACATCAAGATGACCC  |
| BVO 46                   | ATATCTCGAGTTATAGTTCGTCCTTGTGATGGTGGTGATGG<br>G  |
| BVO 50                   | TATATGGATCCACCTGCGGCCGCTGAGGAGACTGTGAGAGT<br>GG   |
| BVO 51                   | GATCCCATCATCACCATCATCATTAAT   |
| BVO 52                   | CTAGATTAATGATGATGGTGATGATGG   |
| BVO 53                   | AAATGCTAGCAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC<br>CATGGCGGGCGTAAGTAAGTAAGCGGCCGCTGGATCCCATC<br>ATCACCATCATCAT   |
| BVO 54                   | TTAAGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGCTTCCTTTTCGG<br>GCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCTAGATTAATGATGATGGTGAT<br>GATGGGATCCAGCGG |
| BVO 55                   | GGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACG   |
| BVO 56                   | GACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTATGC  |
| BVO 60                   | TTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG   |
| BVO 61                   | AAATTCTAGATATATCCGGAACCGCCTCCGAATACAGATGGT<br>GCAGCC  |
| BVO 74                   | AAATCTAGATATATCCGGAACCGCCTCCAGACGACGGGAACA<br>GAGTGACCG   |
| BVO 75                   | GCCTTTCTCTCCACAGGCGCGC  |
| CM 7                     | TGACCGCGCACCAGGCCTGCCACCTGC   |
| CM 8                     | TGGTGCGCGGTCAGCGCGGCCAGGCTG   |
| CM 9                     | AACGACGAGGCCGCGCGGCCAGCGC   |
| CM 10                    | CCTGCCGGACGAAGCGCTCGCTCTCG  |
| CM 42                    | TAATACGACTCACTATAGG   |
| CM 43                    | GCTAGTTATTGCTCAGCGG   |
| CM 90                    | ATATAAGCGCGCACTCCGAGGTGCAACTGTTGGAG   |
| M13-(-40)-fwd            | GTTTTCCCAGTCACGAC   |
| M13-rev                  | CAGGAAACAGCTATGAC   |
| MH-pOPE-r2               | CTGATCATTAGCACAGGCC   |
| MK-myc-r                 | GATCCTCTTCTGAGATGAG   |
| MK-PelB-f                | GCCTACGGCAGCCGCTGG  |
| NBD-(LS7)-fwd            | TATAAAGGATCCGTCCGGCTGCAGGAGAAGC   |
| NBDsII-HIS-KDEL-XbaI-rev | ATATTATCTAGATTATAGTTCGTCCTTGTGATGGTGGTGATGG<br>TGGGATCCTGAGGCCTGCTCCAGGCA                                     |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| PelB-Leader-3'-rev      | CGCCATGGCCGGCTGAGCTGCC                           |
| PelB-NcoI-aTFR-fwd      | TAAATGCCATGGCGGACATCAAGATGACCCAGTCTCC            |
| Polyhedrin-Promotor-fwd | TATCCGGATTATTCATACCGTCCC                         |
| pOPE-Seq-II-fwd         | CAATGATACTTAGATTCAAGTGTGAGCGG                    |
| pOPE-Seq-II-rev         | CGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCC                       |
| pICZ-Myc-His-Xho-rev    | TTTAAACTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGGTCGACGGC<br>GC |
| pFastBac-fwd            | TCCGGATTATTCATACCGTCCC                           |
| pFastbac-rev            | CCTCTACAAATGTGGTATGGCTG                          |
| StrepTag-MluI-fwd       | TTAATAACGCGTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCG               |

#### 2.1.14 Enzyme für die Molekularbiologie

| Enzym                        | Hersteller         | Anwendung                             |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Red Taq DNA Polymerase       | Sigma              | Kolonie-PCR, TOPO-TA Cloning-Kit      |
| Phusion DNA Polymerase       | Finnzymes          | PCR                                   |
| DNAseI                       | Sigma              | DNS-Verdau nach Zellaufschluss        |
| Alkalische Phosphatase (CIP) | NEB                | Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten |
| T4-DNA-Ligase                | Promega            | Ligation restringierter DNS-Fragmente |
| T4-Polynukleotid-Kinase      | NEB                | Phosphorylierung von DNS-Fragmenten   |
| Restriktionsendonukleasen    | NEB, MBI Fermentas | Restriktion von DNS-Fragmenten        |

#### 2.1.15 Antigene für proteinbiochemische Methoden

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| CD71 (humaner Transferrinrezeptor 1) | Biotrend     |
| BSA                                  | Sigma, Serva |
| Lysozym                              | Carl Roth    |

#### 2.1.16 Peptide für proteinbiochemische und zellbiologische Methoden

Alle Peptide wurden von der AG Ronald Frank, HZI, Braunschweig, produziert.

| Peptidname     | Aminosäuresequenz                 |
|----------------|-----------------------------------|
| MUC1 32mer+Cys | APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAC |
| TAT-NBD5       | YGRKKKRRQRRRGTDLWSWLQTE           |
| TAT-negMutNBD5 | YGRKKKRRQRRRGTDASALQTE            |

### 2.1.17 Antikörper und Antikörperkonjugate

| Antikörper                                    | Hersteller / Referenz |
|---|-----------------------|
| Maus anti-CD71 IgG (Klon DF 1513)             | Biotrend, Sigma       |
| Maus anti-M13-HRP                             | Amersham              |
| Maus anti-PentaHis IgG                        | Qiagen                |
| Maus anti-His6 IgG                            | Roche                 |
| Maus anti-StrepTag IgG                        | Qiagen                |
| Ziege anti-human IgG (polyvalent)             | Sigma                 |
| Ziege anti-human IgG (Gamma-Kette)            | Sigma                 |
| Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP        | Sigma                 |
| Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC      | Sigma                 |
| Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP      | Sigma                 |
| Ziege anti-Maus IgG (H&L-Kette)-AlexaFluor488 | Invitrogen            |

### 2.1.18 Kit-Systeme

|                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Big Dye Sequencing Terminator Kit     | P.E. Applied Biosystems, Waltham, USA |
| GFX DNA and Gel Band Purification Kit | GE Healthcare (München)               |
| NucleoSpin Extract II Kit             | Macherey-Nagel (Düren)                |
| NucleoSpin Plasmid Kit                | Macherey-Nagel (Düren)                |
| GenElute Plasmid Midiprep Kit         | Sigma (Neu-Ulm)                       |
| Gel Filtration LMW Calibration Kit    | GE Healthcare (München)               |
| Luciferase Assay System               | Promega (Madison, WI, USA)            |
| Montage Seq96                         | Millipore (Billerica, MA, USA)        |
| TOPO-TA Cloning-Kit                   | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)        |

### 2.1.19 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen PAA Lab GmbH (Parsing, Österreich), Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Sarstedt), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt am Main), Biorad (München), GE Healthcare (München) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Acrylamidmix („Rotiphorese“) | Roth          |
| dNTP-Mix                     | MBI Fermentas |
| DNA-Probenpuffer (6x)        | MBI Fermentas |
| DAPI                         | Pierce        |

|   |               |
|---|---------------|
| Propidiumiodid                          | Sigma-Aldrich |
| Trypanblau                              | Merck         |
| Trypsin/EDTA-Lösung (Zellkultur)        | PPA Lab GmbH  |
| Biorad Protein Assay (Bradford-Reagenz) | Biorad        |
| Agarose                                 | Serva         |
| Low Melting Point-Agarose               | Sigma         |
| Fungizon (Amphotericin B)               | Gibco-BRL     |
| Neutralrot-Lösung                       | Sigma-Aldrich |
| Humanes IL1-beta (rekombinant)          | eBioscience   |
| X-Gal                                   | Fluka         |

### 2.1.20 Puffer und Lösungen

Die Bestandteile aller Lösungen wurden – soweit nicht anders angegeben – in Reinstwasser (Arium611-Anlage, Sartorius, Göttingen) gelöst und ggf. durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

| Antibiotikum    | Konzentration Stammlösung | Arbeitskonzentration | Bemerkung              |
|-----------------|---------------------------|----------------------|------------------------|
| Ampicillin      | 100 mg/ml                 | 100 µg/ml            | Ampicillin-Natriumsalz |
| Chloramphenicol | 25 mg/ml                  | 25 µg/ml             | in 100% Ethanol gelöst |
| Gentamicin      | 30 mg/ml                  | 30 µg/ml             | Gentamicinsulfat       |
| Kanamycin       | 50 mg/ml                  | 50 µg/ml             | Kanamycinsulfat        |
| Tetracyclin     | 10 mg/ml                  | 50 µg/ml             | in 100% Ethanol gelöst |

|  |            |              |
|--|------------|--------------|
| Acrylamidmix („Rotiphorese“)<br>(Roth) | 30% (w/v)  | Acrylamid    |
|  | 0,8% (w/v) | Bisacrylamid |

|            |           |                        |
|------------|-----------|------------------------|
| APS-Lösung | 100 mg/ml | Ammoniumperoxodisulfat |
|------------|-----------|------------------------|

|                           |        |                   |
|---------------------------|--------|-------------------|
| AP-Substratpuffer (pH9,5) | 100 mM | Tris-HCl          |
|                           | 0,5 mM | MgCl <sub>2</sub> |

|                   |          |                       |
|-------------------|----------|-----------------------|
| AP-Substratlösung |          | AP-Substratpuffer mit |
|                   | 1% (v/v) | NBT-Lösung            |
|                   | 1% (v/v) | BCIP-Lösung           |

|             |          |                                  |
|-------------|----------|----------------------------------|
| BCIP-Lösung | 15 mg/ml | BCIP, gelöst in Dimethylformamid |
|-------------|----------|----------------------------------|

## Material und Methoden

---

|                                  |            |   |
|----------------------------------|------------|---|
| BSA-PBS                          | 2% (w/v)   | BSA in PBSA   |
| Carbonatpuffer (pH9,6)           | 50 mM      | NaHCO <sub>3</sub>  |
| Coomassie-Färbelösung            | 30% (v/v)  | Methanol  |
|                                  | 10% (v/v)  | Essigsäure  |
|                                  | 0,5% (w/v) | Coomassie Blau G250   |
| Coomassie-Entfärbelösung I       | 30% (v/v)  | Methanol  |
|                                  | 10% (v/v)  | Essigsäure  |
| Coomassie-Entfärbelösung II      | 10% (v/v)  | Essigsäure  |
| DAPI-Lösung                      | 100 µg/ml  | 4, 6-Diamidino-2-phenylindol<br>gelöst in 70% (v/v) Ethanol |
| EDTA-Stammlösung                 | 500 mM     | EDTA (Dinatriumsalz)  |
| Entwicklerlösung (Silberfärbung) | 60 g/l     | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                             |
|                                  | 500 µl/l   | Formaldehyd (37%)   |
|                                  | 20 ml/l    | Natriumthiosulfatlösung (Silberfärbung)                     |
| Ethidiumbromidlösung             | 10 mg/ml   | Ethidiumbromid  |
| FACS-Puffer                      | 2% (v/v)   | FCS   |
|                                  | 2 mM       | EDTA  |
|                                  |            | in PBS  |
| Fixierer (Silberfärbung)         | 50% (v/v)  | Methanol  |
|                                  | 12% (v/v)  | Essigsäure  |
|                                  | 500 µl/l   | Formaldehyd (37%)   |
| Glucose-Stammlösung              | 2 M        | Glucose   |
| Harnstoff-Puffer (pH8,0)         | 8 M        | Harnstoff   |
|                                  | 50 mM      | Tris-HCl  |

## Material und Methoden

---

|   |            |                             |
|---|------------|-----------------------------|
| IB-Lysepuffer (pH7,0) ( <i>Inclusion body</i> -Präparation) | 100 mM     | Tris-HCl                    |
|   | 1 mM       | EDTA                        |
|   | 1,5 mg/ml  | Lysozym                     |
| IB-Waschpuffer (pH8,5)                                      | 20 mM      | Tris-HCl                    |
|   | 0,5 mM     | EDTA                        |
|   | 2% (v/v)   | TritonX 100                 |
| IB-Solubilisierungspuffer (pH8,5)                           | 20 mM      | Tris-HCl                    |
|   | 6 M        | Guanidinhydrochlorid        |
| IB-IMAC-Elutionspuffer (pH8,5)                              | 20 mM      | Tris-HCl                    |
|   | 6 M        | Guanidinhydrochlorid        |
|   | 500 mM     | Imidazol                    |
| IB-Rückfaltungspuffer (pH8,5)                               | 50 mM      | Tris-HCl                    |
|   | 500 mM     | L-Arginin                   |
|   | 5 mM       | Glutathion (reduziert, GSH) |
|   | 1 mM       | Glutathion (oxidiert, GSSG) |
| IMAC-Laufpuffer   | 50 mM      | Na-Phosphat, pH8,0          |
|   | 200 mM     | NaCl                        |
| IMAC-Waschpuffer  | 50 mM      | Na-Phosphat, pH8,0          |
|   | 200 mM     | NaCl                        |
|   | 20 – 50 mM | Imidazol                    |
| IMAC-Elutionspuffer   | 50 mM      | Na-Phosphat, pH8,0          |
|   | 200 mM     | NaCl                        |
|   | 250 mM     | Imidazol                    |
| Imidazol-Stammlösung  | 5 M        | Imidazol                    |
| IPTG-Stammlösung  | 1 M        | IPTG                        |

## Material und Methoden

---

|  |              |  |
|--|--------------|--|
| Laemmli-SDS-Probenpuffer (5x)<br>(reduzierend)                 | 3,6% (w/v)   | SDS  |
|  | 50% (v/v)    | Glycerin   |
|  | 0,02% (w/v)  | Bromphenolblau   |
|  | 15% (v/v)    | β-Mercaptoethanol  |
| Lysepuffer (pH8,0)<br>(Aufschlusspuffer für<br>Insektenzellen) | 50 mM        | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                 |
|  | 300 mM       | NaCl   |
|  | 10 mM        | Imidazol   |
|  | 1% (v/v)     | Igepal CA-630 (Detergenz)  |
| Lysepuffer (DNS-Präparation)                                   | 200 mM       | NaOH   |
|  | 1% (w/v)     | SDS  |
| Mowiol-Lösung  | 6 g          | Glycerin   |
|  | 2,4 g        | Mowiol   |
|  | 12 ml        | Tris-HCl (200 mM, pH8,5)   |
|  | 0,1 % (w/v)  | DABCO  |
|  |              | Bei 53 °C lösen, Aliquots bei -20 °C lagern.                     |
| MPBS   | 2% (w/v)     | Milchpulver in PBS   |
| MPBST  | 2% (w/v)     | Milchpulver in PBST  |
| Natriumacetatlösung (pH5,2)<br>(DNS-Präparation)               | 3 M          | Natriumacetat  |
| Natriumthiosulfatlösung<br>(Silberfärbung)                     | 200 mg/l     | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O |
| NBT-Lösung   | 70% (v/v)    | Dimethylformamid   |
|  | 3% (w/v)     | NBT  |
| PBS (pH7,4)  | 8 g/L        | NaCl   |
|  | 0,2 g/L      | KCl  |
|  | 1,44 g/L     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O              |
|  | 0,24 g/L     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                  |
| PBST   | 0,05 % (w/v) | Tween20 in PBS   |



## Material und Methoden

---

|                                 |            |                     |
|---------------------------------|------------|---------------------|
| PEG/NaCl-Lösung                 | 20% (w/v)  | PEG 6000            |
|                                 | 2,5 M      | NaCl                |
| PE-Schocklösung (pH8,0)         | 20 mM      | Tris-HCl            |
|                                 | 20% (w/v)  | Saccharose          |
|                                 | 1 mM       | EDTA                |
| Phagenverdünnungspuffer (pH7,5) | 10 mM      | Tris-HCl            |
|                                 | 20 mM      | NaCl                |
|                                 | 2 mM       | EDTA                |
| SDS-PAGE-Laufpuffer             | 25 mM      | Tris-HCl            |
|                                 | 192 mM     | Glycin              |
|                                 | 0,1% (w/v) | SDS                 |
| SOC-Mg-Stammlösung              | 1 M        | MgCl <sub>2</sub>   |
|                                 | 1 M        | MgSO <sub>4</sub>   |
| Silberlösung (Silberfärbung)    | 0,2% (v/v) | Silbernitrat        |
|                                 | 750µl/l    | Formaldehyd (37%)   |
| Stopplösung (Silberfärbung)     | 50% (v/v)  | Methanol            |
|                                 | 12% (v/v)  | Essigsäure          |
| TAE-Puffer (50x) (pH8,0)        | 2 M        | Tris-Base           |
|                                 | 1 M        | Essigsäure          |
| TE-Puffer (pH8,5)               | 10 mM      | Tris-HCl            |
|                                 | 1 mM       | EDTA                |
| TMB-Lösung A (pH4,1)            | 30 mM      | Kaliumcitrat        |
|                                 | 0,1% (w/v) | Zitronensäure       |
| TMB-Lösung B                    | 10 mM      | Tetramethylbenzidin |
|                                 | 0,3% (v/v) | Wasserstoffperoxid  |
|                                 | 10% (v/v)  | Aceton              |
|                                 | 90% (v/v)  | Ethanol             |

|  |             |                                   |
|--|-------------|-----------------------------------|
| TMB-Substratlösung   | 95,2% (v/v) | TMB-Lösung                        |
|  | 0,1% (w/v)  | Zitronensäure                     |
| Trypanblau-Lösung  | 0,25% (w/v) | Trypanblau in PBS                 |
| Trypsinlösung  | 10 µg/ml    | Trypsin in PBS                    |
| Western-Blot-Transferpuffer  | 25 mM       | Tris-Base                         |
|  | 192 mM      | Glycin                            |
| X-Gal-Stammlösung  | 20 mg/ml    | X-Gal, gelöst in Dimethylformamid |
| Zellpuffer (pH8,0) (DNS-Präparation)   | 50 mM       | Tris-HCl                          |
|  | 10 mM       | EDTA                              |
|  | 100 µg/ml   | RNAse A                           |
| Zellpuffer (pH8,0)<br>(Proteinpräparation aus<br>zytoplasmatischer Produktion) | 50 mM       | Na-Phosphat                       |
|  | 500 mM      | NaCl                              |
|  | ggf. 1 mM   | EDTA                              |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNS-Abschnitten

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden spezifisch DNS-Sequenzen vervielfältigt. Dabei wird ein Reaktionsansatz einem zyklischen Temperaturprogramm unterzogen, wobei doppelsträngige DNS in Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Kurze Oligonukleotide (Primer) lagern sequenzspezifisch an die einzelsträngige DNS-Vorlage an. Eine DNS-Polymerase verlängert die Oligonukleotide entsprechend der Sequenz der DNS-Vorlage.

In dieser Arbeit wurden folgende Ansätze und Temperaturprogramme eingesetzt:

#### Ansatz PCR von Plasmid-DNS-Vorlage

|            |                               |
|------------|-------------------------------|
| 10 µl      | Puffer Phusion HF (5x)        |
| 1 µl       | dNTPs (je 10 mM)              |
| 1 µl       | DMSO                          |
| 0,5 µl     | Polymerase "Phusion" (2 U/µl) |
| 0,5 - 5 µl | DNS-Vorlage (10 – 100 ng)     |
| 1 µl       | Primer 1 (10 µM)              |
| 1 µl       | Primer 2 (10 µM)              |
| auf 50 µl  | Wasser                        |

#### Ansatz Kolonie-PCR

|           |                               |
|-----------|-------------------------------|
| 3 µl      | Puffer RedTaq (10x)           |
| 0,5 µl    | dNTPs (je 10 mM)              |
| 1 µl      | DMSO                          |
| 0,5 µl    | Polymerase "RedTaq" (1 U/µl)  |
|           | DNS-Vorlage: Bakterienkolonie |
| 0,5 µl    | Primer 1 (10 µM)              |
| 0,5 µl    | Primer 2 (10 µM)              |
| auf 30 µl | Wasser                        |

#### Temperaturprogramm PCR von Plasmid-DNS-Vorlage

|          |           |           |
|----------|-----------|-----------|
| 98 °C    | 30 s      | 25 Zyklen |
| 98 °C    | 10 s      |           |
| 50-70 °C | 30 s      |           |
| 72 °C    | 45 - 90 s |           |
| 72 °C    | 5 min     |           |
| 4 °C     | 2 min     |           |
| 16 °C    | ∞         |           |

|                            |
|----------------------------|
| Initiale DNS-Denaturierung |
| DNS-Denaturierung          |
| Primer-Anlagerung          |
| Primer-Elongation          |
| Finale Elongation          |
| Reaktionsstopp             |
| Lagerung                   |

#### Temperaturprogramm Kolonie-PCR

|       |            |           |
|-------|------------|-----------|
| 94 °C | 30 s       | 25 Zyklen |
| 94 °C | 45 s       |           |
| 55 °C | 45 s       |           |
| 72 °C | 90 - 120 s |           |
| 72 °C | 5 min      |           |
| 4 °C  | 2 min      |           |
| 16 °C | ∞          |           |

Die Zeit und Temperatur bei der Primer-Anlagerung richtete sich nach der Länge und dem GC-Gehalt des verwendeten Oligonukleotids. Die Elongationszeit war von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und von der verwendeten Polymerase abhängig. Sollte der PCR-Ansatz für Restriktionen verwendet werden, wurde das Amplifikat mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel) nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

#### **2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNS-Fragmenten**

Zur Analyse von DNS-Proben wurden diese in Agarose-Gelen (0,5 – 2,5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer) elektrophoretisch zusammen mit einem Größenstandard aufgetrennt. Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, in eine Geltasche geladen und das Gel für 30 – 45 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Dem Gel wurde Ethidiumbromid (2 µl Ethidiumbromidlösung pro 50 ml TAE-Puffer) zugesetzt, um die DNS unter UV-Licht an einer Geldokumentationsanlage sichtbar machen zu können.

#### **2.2.1.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Zu klonierende DNS-Fragmente wurden nach einer Elektrophorese aus dem Agarose-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, die Agarose aufgelöst und die DNS aufgereinigt. Dafür wurde das NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Vorgaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*-Zellen**

Für die Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNS wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Zur Isolierung größerer Mengen wurde das GenElute Plasmid Midiprep-Kit (Sigma, Neu-Ulm) verwendet. Die Plasmid-DNS wurde in Wasser oder in 5 mM Tris-HCl (pH8,5) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.1.5 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurden aufgereinigte Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Der erhaltene Wert (OD260) wurde multipliziert mit einem Faktor in Abhängigkeit von der vorliegenden Probe.

mRNS: Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $\text{OD}_{260} \times 40$  [ $\mu\text{g/ml}$ ]

ssDNS: Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $\text{OD}_{260} \times 30$  [ $\mu\text{g/ml}$ ]

dsDNS: Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] =  $\text{OD}_{260} \times 50$  [ $\mu\text{g/ml}$ ]

#### **2.2.1.6 Salz-Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren**

Einem Volumen einer Nukleinsäure-Lösung wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen reinen Ethanol zugegeben und bei RT für 20 min inkubiert. Dann wurde die Lösung für 30 min bei 4 °C bei 15.000 xg zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mehrmals mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in Wasser aufgenommen.

#### **2.2.1.7 Isopropanol-Präzipitation von Nukleinsäuren**

Einem Volumen einer Nukleinsäure-Lösung wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und bei RT für 20 min inkubiert. Dann wurde die Lösung für 30 min bei 4 °C bei 15.000 xg zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mehrmals mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in Wasser aufgenommen.

#### **2.2.1.8 Restriktion von DNS mittels Restriktionsendonukleasen**

Zur Restriktion von DNS-Molekülen wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen mit den Puffern und nach den Vorgaben der Hersteller (NEB; MBI Fermentas) eingesetzt. Restriktionsansätze hatten üblicherweise ein Volumen von 20 – 50 µl und wurden für 2 – 16 h bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen inkubiert.

#### **2.2.1.9 Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten**

Durch die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase wurden 5'-Phosphatreste von DNS-Fragmenten entfernt, um eine Religation von mit Restriktionsendonukleasen geschnittener DNS zu verhindern. Zur Dephosphorylierung wurde dem Restriktionsansatz direkt 1 µl *Calf intestine phosphatase* (CIP, NEB, 10 U/µl) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.1.10 Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Für die Hybridisierung von zwei komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden je 20 µl beider Lösungen (Konzentration je 10 µM) gemischt und in einer PCR-Maschine für 5 min auf 98 °C erhitzt. Die Mischung wurde dann entweder in der PCR-Maschine kontrolliert mit einer Rate von 0,1 °C/s auf 25 °C abgekühlt oder für 45 min bei RT belassen.

#### **2.2.1.11 Hybridisierung partiell überlappender Oligonukleotide und Vervollständigung zu doppelsträngigen DNS-Molekülen**

Für die Hybridisierung von zwei im 3'-Bereich komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden je 15 µl beider Lösungen (Konzentration je 10 µM) und 10 µl Puffer Phusion HF (10x, Finnzymes) gemischt und in einer PCR-Maschine für 5 min auf 98 °C erhitzt. Die Mischung wurde dann entweder in der PCR-Maschine kontrolliert mit einer Rate von 0,1 °C/s auf 25 °C abgekühlt oder für 45 min bei RT belassen. Dann wurden 0,5 µl dNTPs (je 10 mM), 0,5 µl DMSO, 8,5 µl Wasser sowie 0,5 µl DNS-Polymerase Phusion (Finnzymes) dem Ansatz zugefügt und alles zusammen bei 72 °C für 10 min inkubiert.

#### **2.2.1.12 Phosphorylierung von DNS-Fragmenten mittels Polynukleotidkinase**

Das Vorhandensein von 5'-Phosphatresten an DNS-Fragmenten ist Voraussetzung dafür, DNS-Fragmente miteinander ligieren zu können. Zur Phosphorylierung der 5'-Enden hybridisierter Oligonukleotide wurden 20 µl der Lösung der Oligonukleotide mit 4 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x, Promega), 15 µl Wasser und 1 µl Polynukleotidkinase (NEB, 10 U/µl) gemischt und für 45 min bei

34 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation bei 65 °C für 20 min deaktiviert und die hybridisierten, phosphorylierten DNS-Fragmente direkt in Ligationsansätzen verwendet.

#### 2.2.1.13 Ligation von DNS-Fragmenten

DNS-Ligasen katalysieren die kovalente Verknüpfung freier 3'-Hydroxyenden mit 5'-Phosphat-enden von DNS. Ein Ligationsansatz hatte üblicherweise ein Volumen von 20 – 30 µl. In Ligase-Puffer (Promega) wurden 1 µl T4-DNA-Ligase (Promega) und 10 – 50 ng Vektor-DNS mit einem zwei- bis fünffachen molaren Überschuss an zu integrierendem DNS-Fragment vermischt. Der gesamte Ansatz wurde dann über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### 2.2.1.14 Klonierung mit dem TOPO-TA-Kit (Invitrogen)

Das TOPO-TA Cloning-Kit (Invitrogen) wurde nach den Vorgaben des Herstellers dazu verwendet, PCR-Fragmente über eine Topoisomerase-katalysierte Reaktion ungerichtet in die vorgesehene Stelle des Vektors pCR2.1-TOPO einzufügen. Die PCR-Fragmente wurden dafür mit Hilfe der Polymerase RedTaq (Sigma) amplifiziert, da diese Taq-DNS-Polymerase jeweils am 3'-Ende des Amplifikates den notwendigen Adeninnukleotid-Überhang synthetisiert. 2 µl des TOPO-Ansatzes wurden dann in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

#### 2.2.1.15 Sequenzierung von DNS-Fragmenten

Zur Sequenzierung von DNS-Molekülen wurde das Big Dye Sequencing Terminator Kit (P.E. Applied Biosystems) eingesetzt, dem die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) zugrunde liegt. Ein Sequenzieransatz hatte üblicherweise folgende Zusammensetzung:

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| 1 µl       | Big Dye Premix           |
| 1 µl       | Sequenzierprimer (10 µM) |
| 0 – 0,5 µl | DMSO                     |
| 1 – 8 µl   | DNS-Vorlage              |
| auf 10 µl  | Wasser                   |

Der Ansatz wurde dann in einer PCR-Maschine folgendem Temperaturprogramm unterworfen:

|            |       |           |                            |
|------------|-------|-----------|----------------------------|
| 94 °C      | 120 s | 25 Zyklen | Initiale DNS-Denaturierung |
| 94 °C      | 60 s  |           | DNS-Denaturierung          |
| 50 – 75 °C | 60 s  |           | Primer-Anlagerung          |
| 72 °C      | 90 s  |           | Elongation                 |
| 72 °C      | 600 s |           | Finale Elongation          |
| 4 °C       | 120 s |           | Reaktionsstopp             |
| 16 °C      | ∞     |           | Lagerung                   |

Die Temperatur bei der Primer-Anlagerung richtete sich nach der Länge des Sequenzierprimers, seinem Komplementaritätsgrad im Vergleich zur DNS-Vorlage, seinem GC-Gehalt und dem DMSO-Gehalt des Reaktionsansatzes. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über das Montage Seq96-kit (Millipore) gemäß den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt und im Sequenzierautomat „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ analysiert.

## **2.2.2 Allgemeine mikrobiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Lagerung von *Escherichia coli*-Kulturen**

Zur kurzzeitigen Lagerung von *E. coli*-Zellen wurden diese auf geeigneten Agar-Festmedien bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Für die langfristige Lagerung wurden Kulturen in Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler angezogen. 850 µl dieser Flüssigkultur wurden mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Aus einer Glycerin-Lagerkultur oder von einer Einzelkolonie einer Agar-Platte wurde eine 10 ml-Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37 °C bei 230 rpm im Schüttler inkubiert. Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde die Vorkultur 1:100 in 2x 300 ml des gleichen Mediums verdünnt, zur Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen in nur 100 ml des gleichen Mediums. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C und 230 rpm solange im Schüttler inkubiert, bis sie eine Zelldichte von OD600 = 0,5 – 0,6 erreicht hatte (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase).

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde die Kultur 2 – 5 min auf Eis abgekühlt und die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 4000 xg), der Medienüberstand verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 2x 300 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zur vollständigen Entsalzung wiederholt. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 2x 100 ml eiskalter, steriler 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 2 ml eiskalter, steriler, 10%-iger Glycerinlösung vereinigt und als 100 µl-Aliquots in Schraubröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen wurde die Bakteriensuspension der Hauptkultur auf zwei Röhrchen verteilt und die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 4000 xg), der Medienüberstand wurde verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 2x 7,5 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden wie oben zentrifugiert und die Zellen in 15 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Glycerin-Lösung (10% (v/v) Glycerin in 100 mM CaCl<sub>2</sub>)

aufgenommen. Es wurden Aliquots von 150 µl hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.3 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNS**

Für die Transformation von elektrokompenten Zellen mittels Elektroporation wurden 20 – 30 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen auf Eis mit 1 – 5 µl in Wasser gelöster DNS vermischt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Im Elektroporator wurde ein Spannungsimpuls von 1,7 kV angelegt. Danach wurde den Zellen sofort 500 µl 37 °C-warmes SOC-Medium zugegeben und die Suspension für 45 min bei 37 °C und 750 rpm im Schüttelheizblock inkubiert.

Für die Transformation von chemisch-kompenten *E. coli*-Zellen wurden 60 µl Zellen mit 1 – 20 µl DNS-Lösung vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 42 °C für 45 s einem Hitzeschock unterzogen, für 1 min auf Eis abgekühlt, ihnen anschließend 500 µl 37 °C-warmes SOC-Medium zugegeben und so für 45 min bei 37 °C und 750 rpm im Schüttelheizblock inkubiert.

Transformierte Zellen wurden anschließend auf Agar-Festmedien mit geeigneten Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **2.2.3 Phagendisplay**

### **2.2.3.1 Verpackung von scFv-Antikörperfragment-Genbibliotheken**

Die beiden in *E. coli* XL1 MRF' vorliegenden scFv-Antikörperfragment-Genbibliotheken „Tomlinson I“ und „Tomlinson J“ wurden in 200 ml 2xYT-GA-Medium auf eine Zelldichte von OD600 = 0,15 angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler auf eine Zelldichte von OD600 = 0,5 angezogen. Zu 50 ml dieser Kulturen wurden  $3 \times 10^{11}$  cfu an Hyperphage-Partikeln gegeben und die Mischung zur Infektion für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden die infizierten Zellen abzentrifugiert (20 °C, 10 min, 3000 xg) und in je 100 ml 2xYT-Medium mit den Zusätzen Ampicillin und Kanamycin über Nacht bei 30 °C und 200 rpm im Schüttler zur Phagenproduktion inkubiert.

Die Kulturen wurden am folgenden Tag zentrifugiert (4 °C, 10 min, 10.000 xg) und der Überstand zur Phagenfällung in neue Gefäße überführt. Dem Überstand wurde ein Viertel seines Volumens an PEG/NaCl-Lösung zugegeben, das Ganze gemischt und für 1 h auf Eis auf einer Wippe inkubiert. Die ausgefällten Phagen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 60 min, 10.000 xg) pelletiert, in 10 ml Wasser resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 ml PEG/NaCl-Lösung zum zweiten Mal auf Eis für 30 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 30 min, 15.000 xg) wurde das Phagenpellet in 1 ml Phagenverdämpfungspuffer resuspendiert und bei 4 °C gelagert.



### **2.2.3.2 Titration von Phagen**

Eine Vorkultur von *E. coli* XL1-blue MRF' wurde über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler angezogen. Mit 500 µl dieser Vorkultur wurden 50 ml 2xYT-Medium mit Tetracyclin angeimpft und bei 37 °C und 230 rpm inkubiert, bis eine Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5 - 0,7$  erreicht war (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase). Von den zu titrierenden Phagenlösungen wurden Verdünnungen in Phagenverdünnungspuffer angelegt. Je 10 µl verdünnte Phagenlösung wurden mit je 50 µl Bakterienkultur vermischt und für 30 min bei 37 °C zur Infektion inkubiert. Die Phagen übertrugen dabei das Phagemid mit dem Ampicillin-Resistenzgen auf die Bakterien. Die Mischung wurde entweder auf 2xYT-Agarplatten mit Ampicillin vollständig plattiert oder jeweils 10 µl dieser Mischung als Tropfen auf einer 2xYT-Agarplatte mit Ampicillin ausgebreitet und getrocknet, bevor die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Aus der Anzahl der Bakterienkolonien wurde dann auf die Konzentration der infektiösen Phagenpartikel in der titrierten Phagenlösung zurückgerechnet.

### **2.2.3.3 Panning**

Zur Selektion von gegen den humanen Transferrinrezeptor 1 (CD71, hTfR1) gerichteten scFv-Antikörperfragmenten wurde der Boden zweier Vertiefungen einer Maxisorp-96Well-Platte (Nunc) parallel mit je 20 µg CD71 (erste *Panning*-Runde) bzw. 5 µg CD71 (weitere *Panning*-Runden) in 100 µl Carbonatpuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Der Überstand wurde dann abgenommen und die Vertiefungen 3x im ELISA-Waschgerät mit PBST gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Bindestellen in den Vertiefungen der Platte wurde diese mit MPBST gefüllt und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen erneut 3x mit PBST gewaschen.

Je  $5 \times 10^{10}$  scFv-präsentierende Hyperphagen der Tomlinson I- und der Tomlinson J-Bibliothek (erste *Panning*-Runde) bzw.  $1 \times 10^{12}$  M13K07-Phagen (weitere *Panning*-Runden) wurden in 200 µl MPBST vereinigt und für 2 h in einer leeren Vertiefung der 96Well-Platte inkubiert. Dann wurden je 100 µl der präinkubierten Phagen in die gewaschenen, CD71-beschichteten Vertiefungen gegeben und für 2,5 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Vertiefungen 20x mit PBST gewaschen und die gebundenen Phagen durch Inkubation mit 150 µl Triethylamin (100 mM) für 5 min eluiert. Die Lösung wurde dann durch Zugabe von weiteren 150 µl Tris-HCl (pH7,5; 1M) neutralisiert. Die neutralisierten Phagenlösungen beider Vertiefungen wurden vereinigt. Von dieser Lösung wurden 10 µl zur Bestimmung des Titors eingesetzt und der Rest für die Amplifikation der eluierten Phagen verwendet.

### **2.2.3.4 Reinfektion mit M13K07-Phagen**

Aus einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* XL1-blue MRF' wurden 50 ml 2xYT-Medium mit Tetracyclin auf eine Zelldichte von  $OD_{600} < 0,1$  angeimpft und bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler auf eine Dichte von  $OD_{600} = 0,5 - 0,6$  angezogen (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase). Nach einer

*Panning*-Runde wurden die eluierten Phagen mit 20 ml dieser Kultur gemischt, 30 min bei 37 °C ohne Schütteln zwecks Infektion inkubiert und die infizierten Zellen dann abzentrifugiert (RT, 10 min, 3220 xg). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl 2xYT-GA-Medium aufgenommen, auf große 2xYT-GA-Agarplatten (Durchmesser 15 cm) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 5 ml 2xYT-GA-Medium abgeschwemmt und als Glycerinkulturen gelagert.

Mit 100 µl der abgeschwemmten Zellen wurden 50 ml 2xYT-GA-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 – 0,6 bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Zu 5 ml dieser Kultur wurden  $5 \times 10^{10}$  Phagenpartikel des Helferphagen M13K07 gegeben, 30 min bei 37 °C ohne Schütteln zwecks Infektion inkubiert und die infizierten Zellen dann abzentrifugiert (RT, 10 min, 3220 xg). Die Zellen wurden in 30 ml 2xYT-Medium mit den Zusätzen Ampicillin und Kanamycin resuspendiert und für die Phagenproduktion über Nacht bei 30 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (RT, 10 min, 3220 xg) und der phagenhaltige Überstand zur Phagenfällung in neue Gefäße überführt. Dem Überstand wurde ein Viertel seines Volumens an PEG/NaCl-Lösung zugegeben, das Ganze gemischt und für 1 h auf Eis auf einer Wippe inkubiert. Die ausgefällten Phagen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 60 min, 3220 xg) pelletiert und die PEG/NaCl-Lösung vollständig entfernt. Das Phagenpellet wurde in 500 µl Phagenverdämpfungspuffer resuspendiert, Bakterienreste in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (RT, 1 min, 16.000 xg) und der Überstand bei 4 °C gelagert, titriert und ggf. für die folgende *Panning*-Runde eingesetzt.

#### **2.2.3.5 Produktion von löslichen scFv-Antikörperfragmenten in Mikrotiterplatten**

In eine 96Well-Mikrotiterplatte mit Rundboden wurden je Vertiefung 200 µl 2xYT-GA-Medium vorgelegt und mit Einzelklonen infizierter Bakterien (z. B. von einer Titrationsagarplatte) angeimpft. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C und 1400 rpm in einem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert (Masterplatte). Mit 20 µl dieser Vorkultur wurde eine neue Mikrotiterplatte mit 200 µl 2xYT-GA-Medium je Vertiefung angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 1400 rpm im Mikrotiterplattenschüttler angezogen (Produktionsplatte). Der Masterplatte wurden je Vertiefung 40 µl Glycerin zugegeben und die Platte bei -80 °C gelagert.

Die Produktionsplatte wurde zentrifugiert (RT, 10 min, 3220 xg) und der Medienüberstand entfernt. Die Bakterienpellets wurden in je 200 µl 2xYT-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und IPTG (50 µM) resuspendiert und über Nacht bei 30 °C und 1400 rpm im Mikrotiterplattenschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (RT, 10 min, 1000 xg) und der Medienüberstand mit den produzierten scFv-Antikörperfragmenten in eine neue Platte transferiert. Die Überstände wurden dann für weitergehende Analysen z. B. per SDS-PAGE, Western Blot, ELISA oder Durchflusszytometrie verwendet.

## 2.2.4 Proteinproduktion in *Escherichia coli*

### 2.2.4.1 Proteinproduktion in *E. coli* mittels Sekretion ins Periplasma: Produktion in Schüttelkolben

Aus einer Glycerin-Lagerkultur eines rekombinanten *E. coli*-Stammes wurden 20 – 100 ml geeignetes Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden 300 – 2000 ml Medium (2xYT-Medium + Antibiotika + ggf. Glucose) in 300 ml-Portionen in 1-Liter-Erlenmeyerkolben ohne Schikane auf eine Startzellichte von OD600 = 0,1 angeimpft und diese Hauptkulturen bei 37 °C und 230 rpm inkubiert, bis die OD600 einen Wert von 0,6 – 0,9 erreicht hatte (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase). Dann wurde die Expression des Zielgens auf dem Expressionsvektor durch Zugabe von IPTG induziert. Bei pOPE101-Vektoren wurde dafür üblicherweise eine Endkonzentration von 50 µM IPTG, bei pHAL-Vektoren und deren Derivaten eine Endkonzentration von 1 mM IPTG eingesetzt. Die Hauptkultur wurde dann für 3 h bei 230 rpm und 25 – 30 °C weiterinkubiert.

Die Hauptkultur wurde in GS3-Bechern abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 4000 xg) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in eiskalter PE-Schocklösung resuspendiert und für 20 min bei gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Für Produktionszwecke wurde üblicherweise das 0,1-fache des Volumens der Hauptkultur an PE-Schocklösung verwendet. Sollte die Sekretion unterschiedlicher Proteinkonstrukte parallel verglichen werden, so wurde nur für diejenige Kultur mit der höchsten OD600 bei Ernte ( $OD600_{max}$ ) das 0,1-fache des Volumens der Hauptkultur verwendet. Für alle weiteren Kulturen wurde das Volumen mit dem Faktor  $OD600/OD600_{max}$  angepasst, um innerhalb eines Experiments die sekretierte Proteinmenge auf die Zelldichte der Hauptkultur bei Ernte zu normieren.

Die Zellen wurden abschließend in SS34-Röhrchen abzentrifugiert (30 min, 4 °C, 30.000 xg) und verworfen. Der Überstand stellte die periplasmatische Proteinpräparation (PPP) dar. Die PPP wurde meist gegen PBS dialysiert und das Zielprotein dann chromatographisch aufgereinigt.

### 2.2.4.2 Proteinproduktion in *E. coli* mittels Sekretion ins Periplasma: Produktion im Bioreaktor

Für die Produktion des Zielproteins durch Sekretion ins Periplasma wurde ein Minifors-Bioreaktor (Infors) mit 2,5 Litern Arbeitsvolumen verwendet. Als Fermentationsmedium wurde phosphatgepuffertes 2xYT-Medium mit Zusätzen (100 µg/ml Ampicillin, 100 mM Glucose, 500 mM Sorbitol) verwendet. Die Komplexbestandteile des Mediums (40 g Bacto Trypton, 25 g Bacto Yeast Extract, 12,5 g NaCl, 2 ml Ucolub-Antischaummittel) wurden in 1,5 L Wasser gelöst und im Fermenterbehälter autoklaviert. In separaten Gefäßen wurden jeweils 200 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 M), 200 ml NaOH (2 M), 250 ml Phosphatpuffer (pH7,0) und 600 ml Zuckerlösung (49,6 g Glucose und 227,7 g

Sorbitol) autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden der Phosphatpuffer, das Ampicillin und die Zuckerlösung steril mit den Komplexkomponenten im Reaktorgefäß vereinigt.

Aus einer Glycerin-Lagerkultur eines *E. coli* XL1-blue MRF' pOPE101-Stammes wurden 300 ml 2xYT-GA-Medium angeimpft und bei 230 rpm im Schüttler bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 1,8 - 2,5$  inkubiert, bevor mit dieser Vorkultur der Reaktor angeimpft wurde. Die Temperatur zur Inkubation der Vorkultur wurde dabei im Bereich von  $27 - 37\text{ °C}$  gewählt, damit die Vorkultur sich zum Zeitpunkt der Inokulation noch in der Wachstums-, nicht in der Plateauphase befand.

Die Fermentation wurde zunächst bei  $30\text{ °C}$  durchgeführt, um eine Zelldichte von  $OD_{600} > 10$  zu erreichen. Der pH-Wert wurde automatisch durch Zugabe von NaOH (bzw.  $H_3PO_4$ ) auf pH7,0 geregelt. Der  $pO_2$ -Wert (Gelöstsauerstoff) wurde durch Anpassung der Rührerdrehzahl ( $200 - 800\text{ rpm}$ ) auf 30% geregelt. Das Rührsystem bestand aus zwei 6-Blatt-Rushton-Rührern. Als Zuluft wurde Druckluft mit einer konstanten Rate von 1 V/VM ( $2,5\text{ l/min}$ ) verwendet. Alle Parameter sowie die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration in der Abluft wurden von Sensoren gemessen und auf Computern gespeichert.

War eine Zelldichte von  $OD_{600} > 10$  erreicht, so wurde der Reaktor durch Kühlung des Reaktorgefäßes mit Eis auf  $25\text{ °C}$  abgekühlt und die Expression des Zielgens auf pOPE101-Vektoren durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von  $100\text{ }\mu\text{M}$  IPTG induziert. Die Produktion fand für 3 h bei  $25\text{ °C}$  bei sonst unveränderten Parametern statt. Die Aufarbeitung wurde wie bei der Produktion im Schüttelkolben durchgeführt, wobei für die Isolierung der periplasmatischen Proteinfraction 500 ml PE-Schocklösung eingesetzt wurden.

#### **2.2.4.3 Präparation von bakteriellen Zellmembranen**

Um zu überprüfen, ob produziertes Protein beim Sekretionsprozess eine stabile Wechselwirkung mit der bakteriellen Zellmembran einging, wurden zu vergleichende Kulturen wie unter Kapitel 2.2.4.1 beschrieben für eine Proteinproduktion durch Sekretion ins Periplasma im 200 ml-Maßstab induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ( $4\text{ °C}$ , 15 min,  $4000\text{ xg}$ ) pelletiert, der Medienüberstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal in je 100 ml Puffer (30 mM Tris-HCl, pH8,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert ( $4\text{ °C}$ , 15 min,  $4000\text{ xg}$ ). Nach diesen Waschschritten wurden die Zellen in einem auf die Zelldichte normierten Volumen an PE-Schocklösung ( $V\text{ [ml]} = 10 \times OD_{600}$ ) resuspendiert, so dass für alle zu vergleichenden Kulturen die Zellkonzentration in PE-Schocklösung gleich war. Die Suspensionen wurden dann über Nacht bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei RT aufgetaut und 7 ml Zellsuspension durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Sonotrode MS72, Eintauchtiefe: 1 cm, Leistung des Ultraschallgenerators HD2200: 30%, Aufschlussdauer 3 min, gepulst: 0,5 s Leistungsintervall, 0,5 s Ruheintervall). Das Zelllysate wurde zentrifugiert (10 min,  $4\text{ °C}$ ,  $27.000\text{ xg}$ ). Das Pellet enthielt die unlösliche Proteinfraction und wurde im selben Volumen an Harnstoff-Puffer resuspendiert, über Nacht bei  $4\text{ °C}$  unter leichtem Rühren gelöst und eine Probe für die Analyse per SDS-PAGE genommen. Der Überstand nach Zentrifugation des Zelllysates enthielt

die lösliche Proteinfraction, die in der Ultrazentrifuge zentrifugiert wurde (2 h, 4 °C, 175.000 xg). Der Überstand nach Ultrazentrifugation enthielt die zytoplasmatische Proteinfraction und wurde abgenommen. Das Pellet wurde im selben Volumen an TE-Puffer resuspendiert. Ein Teil des resuspendierten Pellets wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (1 min, RT, 16.000 xg) und der Überstand mit der Membranfraction ohne unlösliche Verunreinigungen gesichert. Die lösliche Proteinfraction einer Kultur wurde dann im Western Blot jeweils mit der zytoplasmatischen Fraction und der Membranfraction verglichen, um die Verteilung des produzierten, löslichen Zielproteins auf diese beiden Fractionen zu beurteilen.

#### **2.2.4.4 Proteinproduktion durch Rückfaltung bakterieller *Inclusion bodies***

Für die Produktion von Zielproteinen in Form von bakteriellen *Inclusion bodies* wurden *E. coli* BLR(DE3)-Zellen verwendet, die mit dem Zielgen auf pET21-Vektoren transformiert worden waren. Aus einer Glycerin-Lagerkultur wurden 20 – 100 ml geeignetes Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden 300 – 2000 ml geeignetes Medium in 300 – 500 ml-Portionen in 1-Liter- oder 2-Liter-Erlenmeyerkolben ohne Schikane auf eine Startzellichte von OD600 = 0,1 angeimpft und diese Hauptkulturen bei 37 °C und 230 rpm inkubiert, bis die Zelldichte einen Wert von OD600 = 0,6 – 0,9 erreicht hatte (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase). Dann wurde die Expression des Zielgens auf dem Expressionsvektor durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Die induzierte Kultur wurde für 3 h bei 30 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 4000 xg) und im Volumen  $V_0$  in IB-Lysepuffer resuspendiert (5 g Zellnassmasse/60 ml Puffer). Durch Ultraschallbehandlung wurden die Zellen anschließend aufgeschlossen (Sonotrode MS73, Eintauchtiefe: 1 cm, Leistung des Ultraschallgenerators HD2200: 50%, Aufschlussdauer 5 min, gepulst: 0,5 s Leistungsintervall, 0,5 s Ruheintervall). Nach dem Aufschluss wurden DNase I (Endkonzentration 10 µg/ml) und  $MgCl_2$  (Endkonzentration 3 mM) zugegeben und für 30 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Das Volumen des Zelllysates wurde auf  $3 \times V_0$  aufgefüllt durch Zugabe von TritonX 100 (Endkonzentration 2% (v/v)), NaCl (Endkonzentration 1,5 M), EDTA (Endkonzentration 20 mM), Tris-HCl (pH7,0) (Endkonzentration 100 mM) und Wasser. Das Lysat wurde erneut für 20 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (15 min, 4 °C, 17.000 xg). Das Pellet enthielt die unlösliche Proteinfraction mit den *Inclusion bodies*, der Überstand wurde verworfen.

Die unlösliche Proteinfraction wurde in 80 ml IB-Waschpuffer resuspendiert, 15 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert und dann abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 17.000 xg). Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Das Pellet nach dem zweiten Waschschrift wurde in 20 ml IB-Solubilisierungspuffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren gelöst. Danach wurden die solubilisierten *Inclusion bodies* zentrifugiert (30 min, 4 °C, 30.000 xg) und das verbleibende Pellet verworfen, während der Überstand für Rückfaltungsexperimente verwendet wurde.

Zur vollständigen Reduktion aller bestehenden Disulfidbrücken in den solubilisierten *Inclusion bodies* wurde der Proteinlösung DTT (Endkonzentration 100 mM) zugesetzt und die Lösung bei 4 °C für 2 h inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch die Methode des „Schnellen Verdünnens (*rapid dilution*)“ durchgeführt: 1,5 l IB-Rückfaltungspuffer, der auf 12 °C temperiert worden war, wurde intensiv gerührt. In 6 Schritten wurden jeweils 1,5 ml der Lösung reduzierter und solubilisierter *Inclusion bodies* im Abstand von je 30 min in den Rückfaltungspuffer eingetropft. Die Lösung wurde danach bei 12 °C für 65 h weiter unter starkem Rühren inkubiert.

Die Proteinlösung in Rückfaltungspuffer wurde durch eine 0,45 µm-Celluloseacetat-Membran filtriert. Dann wurde sie in einer Amicon 8200-Zelle (Millipore) unter Stickstoff-Druck auf 50 ml ankonzentriert und durch mehrfache Zugabe von PBS umgepuffert. Die umgepufferte, rückgefaltete Proteinlösung wurde dann für weitere Experimente eingesetzt.

#### 2.2.4.5 Proteinproduktion im Zytoplasma von *E. coli*-Zellen

Die Produktion von löslichen, nativen, Disulfidbrücken-enthaltenden Zielproteinen im bakteriellen Zytoplasma wurde mit speziellen *E. coli*-Stämmen durchgeführt. Diese wurden mit das Zielgen enthaltenden pET21-Vektoren transformiert. Die Stämme erforderten aufgrund ggf. vorhandener zusätzlicher Hilfsplasmide unterschiedliche Antibiotika im Medium:

| Stamm mit pET21-Vektor           | Medium  |
|----------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> BLR(DE3)          | 2xTY + Ampicillin   |
| <i>E. coli</i> Origami(DE3)      | 2xTY + Ampicillin + Kanamycin + Tetracyclin                   |
| <i>E. coli</i> Rosetta-gami(DE3) | 2xTY + Ampicillin + Kanamycin + Tetracyclin + Chloramphenicol |

Aus einer Glycerin-Lagerkultur eines rekombinanten *E. coli*-Stammes wurden 20 – 50 ml geeignetes Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden 300 – 900 ml geeignetes Medium in 300 ml-Portionen in 1-Liter-Erlenmeyerkolben ohne Schikane auf eine Startzellichte von OD600 = 0,1 angeimpft und diese Hauptkulturen bei 37 °C und 230 rpm inkubiert, bis die Zelldichte einen Wert von OD600 = 0,8 – 1,0 erreicht hatte (Kultur in logarithmischer Wachstumsphase). Dann wurde die Expression des Zielgens auf dem Expressionsvektor durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 – 1 mM IPTG induziert. Die Hauptkultur wurde dann für 3 h bei 230 rpm und 30 °C weiterinkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 4000 xg) und in Zellpuffer ohne EDTA resuspendiert, wobei das Volumen an die Zelldichte (OD600 zum Zeitpunkt der Ernte) angepasst wurde ( $V(\text{Puffer}) = V(\text{Hauptkultur}) \cdot \text{OD600} / 25$ ). Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Sonotrode MS73, Eintauchtiefe: 1 cm, Leistung des Ultraschallgenerators HD2200: 50%, Aufschlussdauer 5 min, gepulst: 0,5 s Leistungsintervall, 0,5 s Ruheintervall). Das Zelllysate wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 30.000 xg). Das Pellet enthielt die unlösliche Proteinfraction, der Überstand hingegen die lösliche Proteinfraction, aus der sofort das Zielprotein chromatographisch

aufgereinigt wurde. Ein Teilpellet der unlöslichen Proteinfraction wurde in seinem ursprünglichen Volumen an Harnstoffpuffer aufgenommen, über Nacht gelöst und eine Probe per SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.4.6 Probenahme zur Kontrolle der Proteinproduktion**

Direkt vor der Induktion und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Induktion wurden der Kultur je 1 ml-Proben entnommen und direkt nach Entnahme in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (1 min, RT, 15.000 xg). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen, wobei das Volumen auf die OD600 zum Zeitpunkt der Probenahme normiert wurde (100 µl Puffer/OD600). Die Probe wurde für 5 min bei 95 °C bei 1400 rpm im Schüttelheizblock aufgeköcht. Durch Vergleich der Zelllysate-Proben im Western Blot mit anschließender Immunfärbung wurde die erfolgreiche Induktion des Zielgens kontrolliert. Bei der weiteren Aufarbeitung wurden von jedem Schritt Proben für eine SDS-PAGE-Analyse und ggf. für weitere proteinbiochemische Analysen genommen.

### **2.2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.5.1 Dialyse und Umpufferung von Proteinlösungen über „Desalting-Säulen“**

Zur Dialyse wurden Proteinlösungen in Dialyseschläuche (MWCO 10 kDa) gefüllt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren in Gefäße mit dem 30 – 100-fachen Volumen an Dialysepuffer – meist PBS – inkubiert. Bei Bedarf wurde dieser Schritt mehrfach wiederholt.

Alternativ wurden 1 ml-Portionen von Proteinlösungen gemäß den Vorgaben des Herstellers über HiTrap Desalting 5 ml-Säulen (GE Healthcare) am FPLC-System ÄKTAPurifier umpuffered. Dabei wurde das Eluat so fraktioniert, dass je eine schwach konzentrierte Vor- und Nachlaufraction sowie eine hochkonzentrierte Mittelfraction entstanden.

#### **2.2.5.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Gelmatrix wird durch die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid erzeugt. Der Ladepuffer enthält Natriumdodecylsulfat, welches an die hydrophoben Bereiche der Proteine bindet und mit seiner negativen Eigenladung die native Ladung des Proteins maskiert. Es wurde zunächst ein engmaschiges Trenngel gegossen. Nach dessen Polymerisation wurde es mit einem grobmaschigen

Sammegel mit niedrigerem pH-Wert überschichtet, was eine Konzentrierung der Proteinproben am Übergang der Gele zueinander ermöglichte. Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

|                                  | Trenngel<br>(12% Acrylamid) | Sammegel<br>(4% Acrylamid) |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Wasser                           | 1,625 ml                    | 1,0 ml                     |
| Acrylamid-Mix (30%) (Rotiphoese) | 2,0 ml                      | 0,26 ml                    |
| 1,5 M Tris pH 8,8                | 1,25 ml                     | ---                        |
| 1,0 M Tris pH 6,8                | ---                         | 0,2 ml                     |
| 10 % SDS                         | 50 µl                       | 15 µl                      |
| 10 % APS                         | 50 µl                       | 15 µl                      |
| TEMED                            | 2,5 µl                      | 2 µl                       |

Proben wurden mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Pro Geltasche wurden 3 – 10 µl Probe aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 35 mA für 30 min. Die Gele wurden anschließend gefärbt oder für einen Western Blot eingesetzt.

#### **2.2.5.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelelen**

Gele wurden nach der SDS-PAGE in Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle kurz aufgekocht, einmal kurz mit Coomassie-Entfärbelösung I gewaschen, dann für 30 min mit Entfärbelösung I auf einer Wippe inkubiert. Danach wurden die Gele in Coomassie-Entfärbelösung II transferiert und kleine Stücke Zellstoffpapier in die Schale gelegt, um den in Lösung gehenden Farbstoff aufzunehmen und eine bessere Entfärbung des Hintergrundes zu erreichen. Die Gele wurden dazu auf einer Tischwippe weiter entfärbt, bis die Proteinbanden mit ausreichendem Kontrast erkennbar wurden.

#### **2.2.5.4 Silberfärbung von SDS-Gelelen**

Gele wurden nach der SDS-PAGE für mindestens 2 h in Fixierer inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in 50% (v/v) Ethanol für je 20 min. Danach wurden die Gele für genau 1 min in Natriumthiosulfatlösung inkubiert, danach für 20 s in Wasser gewaschen und für 20 min in Silberlösung eingelegt. Danach wurden sie erneut zweimal für je 20 s in Wasser gewaschen. Die Färbung erfolgte in Entwicklerlösung, bis die Banden mit ausreichendem Kontrast erkennbar wurden. Die Gele wurden dann zweimal für je 2 min in Wasser gewaschen, bevor die Färbung in Stopplösung endgültig abgebrochen wurde.



#### **2.2.5.5 Western Blot und Immunfärbung**

Durch den Western Blot werden Proteine elektrophoretisch aus einem SDS-Gel auf eine Membran transferiert. Dazu wird ein Filterpapier in Gelgröße in Western Blot-Transferpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der Transfereinheit platziert. Darauf wurde eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und das Gel darauf luftblasenfrei positioniert. Auf das Gel wurde ein weiteres getränktes Stück Filterpapier gelegt und die Kathodenplatte aufgesetzt. Der Transferlauf wurde für 45 min bei 20 V Spannung durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in MPBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzublocken. Dann wurde die Membran mit in MPBS verdünnten Antikörpern für je 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Der Maus anti-PentaHis IgG wurde üblicherweise 5000-fach, der Maus anti-StrepTag II IgG 10.000-fach aus einer Stammlösung (100 µg/ml) verdünnt, das Ziege anti-Maus IgG (Fc spezifisch)-AP-Konjugat 10.000-fach verdünnt eingesetzt.

Zwischen zwei Antikörperinkubationen wurde die Membran jeweils 2x kurz mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit PBS auf einer Wippe inkubiert. Der letzte Antikörper war immer ein Konjugat mit Alkalischer Phosphatase. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran kurz in AP-Substratpuffer gewaschen und dann mit AP-Substratlösung bei RT inkubiert, bis eine deutliche Färbung erkennbar war.

#### **2.2.5.6 Affinitätschromatographische Proteinreinigung**

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen wurde entweder im *Batch*-Verfahren mit freier Matrix (Chelating Sepharose FF, GE Healthcare) oder mit in einer Säule gepackten Matrix (HisTrap 1 ml-Säule, GE Healthcare) an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Zur Aufreinigung von Proteinen mit einem 6xHis-Tag wurde die jeweilige mit Nickelionen beladene und mit IMAC-Laufpuffer äquilibrierte Chromatographiematrix mit der zielproteinhaltigen Proteinlösung inkubiert. Durch das Mischen von IMAC-Laufpuffer und IMAC-Elutionspuffer wurden Waschpuffer mit Konzentrationen von 20 – 50 mM Imidazol hergestellt und unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine mit diesen Puffern abgewaschen. Das Zielprotein wurde mit reinem Elutionspuffer von der Matrix abgelöst. Von jedem Aufreinigungsschritt wurden Proben für die Analyse per SDS-PAGE genommen.

Als FPLC-Anlage wurde für affinitätschromatographische Aufreinigungen eine ÄKTAPrime-Anlage mit einer HisTrap 1 ml-Säule bei 4 °C bei einer Flussrate von 1 – 2 ml/min eingesetzt. Die Probenlösung mit dem ungebundenen Protein wurde nach dem Lauf über die Säule aufgefangen und als „Durchlauf“ bezeichnet. Nach dem Beladen wurde solange mit Laufpuffer nachgewaschen, bis das Signal des UV-Monitors keine erhöhte Absorption mehr zeigte. Es wurde stufenweise die Imidazolkonzentration erhöht und jeweils nachgewaschen, bis das UV-Signal keine erhöhte Absorption mehr zeigte. Wasch- und Elutionsfraktionen wurden in Fraktionen von je 0,5 – 1,2 ml Volumen aufgefangen.

In der Aufreinigung im *Batch*-Verfahren wurden freie Matrixpartikel zur Beladung mit der Probe für 1 – 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation (4 °C, 5 min, 300 xg) mit dem ungebundenen Protein wurde als „Durchlauf“ bezeichnet. Die Matrix wurde mit Waschpuffern für 0,5 – 1 h im Überkopfschüttler bei 4 °C gewaschen und jeweils durch Zentrifugation (4 °C, 5 min, 300 xg) abgetrennt. Die Überstände stellten die Waschfraktionen dar. Zur Elution wurde die Matrix mit einem kleinen Volumen an IMAC-Elutionspuffer für 10 min auf Eis unter mehrfachem Aufschütteln inkubiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand stellte die Elutionsfraktion dar.

#### **2.2.5.7 Gelfiltration**

Gelfiltrationsläufe wurden an der FPLC-Anlage ÄKTAPurifier bei 4 °C mit PBS als Laufpuffer durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden die Säulen Superdex75 10/300 bzw. Superdex200 10/300 eingesetzt, für präparative Zwecke wurden HiLoad16/60-Säulen mit Superdex75- bzw. Superdex200-Matrix eingesetzt. Für die Kalibrierung des Retentionsvolumens gegen die Molekülgröße wurde das Gelfiltration LMW Calibration-Kit (GE Healthcare) verwendet.

#### **2.2.5.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde Bradford-Reagenz (Biorad) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet. Die Verdünnungen der Standards und der Proben wurden in 96Well-Platten angesetzt, inkubiert und schließlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm ausgelesen.

Alternativ wurden Verdünnungsreihen von Proben und Verdünnungsreihen von Standardproteinen per SDS-PAGE auf einem Gel aufgetrennt und anschließend ein Nachweis durch Coomassie-Färbung, Silberfärbung oder Western Blot mit Immunfärbung durchgeführt. Durch den Vergleich der Bandenstärken zwischen Proben- und Standardproteinen wurde die Konzentration des Proteins abgeschätzt.

#### **2.2.5.9 ELISA**

Über Nacht wurden 100 – 1000 ng Protein (CD71: 70 – 100 ng) in 100 µl Carbonatpuffer pro Vertiefung an Maxisorp-96Well-Platten gebunden. Der Überstand wurde abgenommen und die Vertiefungen der Platte zum Abblocken unspezifischer Bindestellen mit BSA-PBS oder MPBS gefüllt und für 1,5 h bei RT inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden in einer feuchten Kammer statt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Die Platte wurde dann 3x mit PBST im ELISA-Waschgerät gewaschen. Je 100 µl Probenvolumen (ggf. in PBS verdünnt) bzw. Nachweisantikörper (in je 100 µl Blockreagenz verdünnt) wurden für 1 – 1,5 h in den Vertiefungen bei RT inkubiert, wobei nach den

einzelnen Inkubationsschritten jeweils Waschschr tte durch 3-maliges Waschen der Vertiefungen mit PBST im ELISA-Waschgerät folgten. Als letzter Nachweisantikörper wurde stets ein HRP-Konjugat verwendet. Nach dem letzten Waschschr tt wurden 100 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung gegeben und die Platte im Dunkeln bei RT inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung erkennbar wurde. Dann wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure (1 M) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Der Maus anti-PentaHis IgG wurde üblicherweise 2500-fach aus einer Stammlösung (100 µg/ml) verdünnt. Das Maus anti-M13-HRP-Konjugat wurde 5000-fach, das Ziege anti-Maus IgG-(Fab spezifisch)-HRP-Konjugat 10.000-fach verdünnt eingesetzt.

## **2.2.6 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.6.1 Zählung und Lagerung von Mammalia- und Insektenzellen**

Die Zellzahl wurde durch Zählung unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Bei Bedarf wurde bei dieser Zählung die Probe mit Trypanblau-Lösung verdünnt, tote Zellen werden dadurch blau gefärbt, während lebende Zellen farblos bleiben. Zellen wurden bei Bedarf schonend zentrifugiert (4  C – RT, 5 min, 300 xg). Zur längerfristigen Lagerung wurden Zellen in ihrem entsprechenden Kulturmedium mit 20% DMSO und 20% FCS als Zusätzen verdünnt und auf 2 ml-Schraubgef  e verteilt. Um ein langsames Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden die Schraubgef  e für zwei Tage in einem isolierten Behältnis bei -80  C gekühlt, bevor sie in flüssigen Stickstoff transferiert wurden.

### **2.2.6.2 Kultivierung von Insektenzellen**

Sf9- und Tn5-Zellen wurden in 250 ml-Glas-Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 27  C auf einem Schüttler mit 50 mm-Orbital bei 100 rpm in 30 – 50 ml jeweiligem Medium in Suspension kultiviert. Beim Erreichen einer Zelldichte von über  $2,5 \times 10^6$ /ml wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Dichte von  $4 - 5 \times 10^5$ /ml verdünnt und in einem neuen Kolben weiterkultiviert.

### **2.2.6.3 Generierung von rekombinanten Baculoviren**

Grundlage der Methodik bildete das Handbuch „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System“ (Version D, Stand 6. April 2004, Invitrogen). Zusammengefasst wurde das Gen des zu produzierenden Zielproteins in den Transfervektor pFastBac1 einkloniert. Kompetente *E. coli* DH10-Bac-Zellen wurden mit dem Vektor transformiert und über Antibiotika-Selektion und Blau-Weiß-Selektion Bakterienklone identifiziert, bei denen das Zielgen erfolgreich in das Baculovirus-Genom integriert wurde. Aus

derartigen Klonen wurde die Bacmid-DNS isoliert, indem die *E. coli*-DH10-Bac-Zellen mit den Lösungen des NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren) aufgeschlossen wurden und die DNS mittels Salz-Ethanol-Präzipitation gewonnen wurde. Mittels PCR mit den Primern M13 (-40) fwd und M13 rev wurde die Bacmid-DNS auf Homogenität und den Erfolg der Insertion des Zielgens hin überprüft.

Zur Produktion von rekombinanten Baculoviren wurden Sf9-Zellen mit der Bacmid-DNS transfiziert. Die Vertiefung einer 6Well-Zellkulturplatte wurde mit  $1 \times 10^6$  Zellen beschichtet, dafür wurden die Zellen in 2 ml Medium für 30 min bei 27 °C inkubiert. 5 µl Bacmid-DNS wurden mit 45 µl sterilem Wasser vermischt. Parallel wurden 5,5 µl Transfektionsreagenz (Lipofectin, Gibco BRL) mit 44,5 µl Wasser vermischt. Die verdünnte Bacmid-DNS-Lösung und die verdünnte Transfektionsreagenz-Lösung wurden anschließend vereinigt, für 15 min bei RT inkubiert und dann auf die adhärenierten Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation bei 27 °C wurden vorsichtig weitere 2 ml Medium zugegeben. Nach weiteren 72 h Inkubation wurde der virushaltige Medienüberstand abgenommen, neues Medium aufgetropft und dieses nach weiteren 48 h Inkubation abgenommen. Beide Ernten wurden vereinigt und durch Zentrifugation (RT, 10 min, 1000 xg) geklärt. Der virushaltige Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.6.4 Titerbestimmung von rekombinanten Baculoviren (Plaque Assay)**

Von den zu titrierenden Baculovirus-Suspensionen wurden Verdünnungen in Sf9-Medium hergestellt. Je  $1,5 \times 10^5$  Sf9-Zellen wurden zwecks Adhäsion für 1 h bei 27 °C in den Vertiefungen von 6Well-Zellkulturplatten inkubiert. Der Medienüberstand wurde abgezogen und 1 ml Virussuspension vorsichtig auf die Zellen einer Vertiefung gegeben, danach wurden die Zellen zwecks Infektion erneut für 1 h bei 27 °C inkubiert. Der Medienüberstand wurde dann abgezogen und schnellstmöglich durch 2 ml Plaque-Overlay-Medium (kurzfristig bei 40 °C flüssig gehalten) ersetzt. Nach Verfestigung des Mediums wurde die Platte über Kopf für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Um die entstandenen Plaques besser sichtbar zu machen, wurden je 300 µl Neutralrotlösung (7-fach verdünnt in Sf9-Medium) pro Vertiefung aufgegeben, für 3 h inkubiert und Restflüssigkeit dann abgezogen. Die Zellen wurden erneut über Nacht bei 27 °C weiterinkubiert, am folgenden Tag die Plaques gezählt und die Konzentration der infektiösen Viruspartikel (Titer) errechnet.

#### **2.2.6.5 Amplifikation von Baculovirus-Titern**

Zur Gewinnung höherkonzentrierter Virussuspensionen wurden in 250 ml-Glas-Erlenmeyerkolben 30 – 50 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $1,0 - 1,5 \times 10^6$ /ml mit Baculoviren infiziert, wobei ein Anzahlsverhältnis Viren/Zelle (*multiplicity of infection*, MOI) = 0,1 gewählt wurde. Die Zellen wurden dann für 6 Tage bei 27 °C bei 100 rpm auf einem Schüttler mit 50 mm-Orbital inkubiert und der Medienüberstand mit den Baculoviren nach Zentrifugation bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.6.6 Proteinproduktion in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren**

In 500 ml Glas-Erlenmeyerkolben ohne Schikane wurden je 100 ml Sf9-Zellen bei einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$ /ml mit Baculoviren infiziert, wobei ein Anzahlsverhältnis Viren/Zelle (*multiplicity of infection*, MOI) = 1 – 10 gewählt wurde. Die Zellen wurden für 96 h bei 27 °C bei 100 rpm auf einem Schüttler mit 50 mm-Orbital inkubiert. Alle 24 h wurden Proben des Medienüberstandes und der Gesamtkultur für die Analyse per SDS-PAGE und Western Blot genommen. Nach Ernte durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 200 xg) wurde der Medienüberstand zur Aufreinigung des Zielproteins 5-fach mit konzentriertem IMAC-Laufpuffer (10x) verdünnt. Zur Aufarbeitung des intrazellulären Zielproteins wurden die Zellen in 50 ml Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 10.000 xg), der Überstand enthielt die lösliche, intrazelluläre Proteinfraction, aus der das Zielprotein aufgereinigt wurde.

#### **2.2.6.7 Kultivierung und Passage von Mammalia-Zellen**

Alle Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wuchsen adhärent auf Zellkulturplatten in Zellkulturinkubatoren bei 37 °C unter Kohlendioxid-Atmosphäre (HeLa, HEK239T, HEK293 Luc und MCF7: 7% CO<sub>2</sub>, CHO TRVb und CHO TRVb-1: 5% CO<sub>2</sub>) bei 96% relativer Luftfeuchte (Medien: siehe Kapitel 2.1.10). Beim Erreichen der konfluenten Zelldichte wurde der Medienüberstand abgezogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung für 2 – 5 min bei RT abgelöst und ein Teil der Zellen mit neuem Medium auf einer neuen Kulturplatte ausgesät.

#### **2.2.6.8 Internalisierungsassay**

Um die Internalisierung von Antikörpern und Antikörperfusionsproteinen durch Mammalia-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern ausgesät und zu 50 – 75%-iger Konfluenz angezogen. Dann wurden die Deckgläser auf mit Parafilm bespannten Unterlagen ausgelegt und mit den zu internalisierenden Fusionsproteinen – verdünnt in Medium – für üblicherweise 1 h inkubiert. Dabei wurde jede Probe einmal bei 37 °C (aktive Internalisierung) sowie bei 4 °C (keine Internalisierung, Oberflächenfärbung) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS für 15 min bei 37 °C fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte nach einem erneuten Waschen mit PBS durch 10-minütige Inkubation mit 0,2% (v/v) TritonX 100 in PBS bei RT. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen werden die fixierten und permeabilisierten Zellen mit BSA-PBS bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte ggf. durch Inkubation mit Maus anti-His6 IgG (1 ng/μl in BSA-PBS) für 1 h bei RT, mehrfachem Waschen mit PBS und folgender Inkubation mit Ziege anti-Maus-IgG (Fc-spezifisch)-FITC-Konjugat oder Ziege anti-Maus IgG (H&L-Kette)-AlexaFluor488 (jeweils 1 μg/μl in BSA-PBS). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI-Lösung (1 μg/ml in Wasser) für 5 min bei RT. Nach erneutem intensiven Waschen mit PBS und einem abschließenden Waschschriff mit Wasser wurden die

Deckgläser getrocknet und auf Objektträgern mit Mowiol-Lösung versiegelt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bzw. unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

#### **2.2.6.9 Durchflusszytometrie**

Zum Nachweis der Bindung an Zellen und der Spezifität von Fusionsproteinen wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Je  $1 - 2 \times 10^5$  Zellen in Medium wurden in FACS-Röhrchen überführt und je 3 ml FACS-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 300 xg) und der Überstand vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 100 µl Proteinlösung, ggf. verdünnt in PBS, resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen durch Zugabe von 3 ml FACS-Puffer, Zentrifugation (5 min, 4 °C, 300 xg) und Entfernung des Überstandes. Die Zellen wurden dann in zwei aufeinander folgenden Färbeschritten mit je 100 µl der Lösungen der Nachweis-Antikörper für je 1 h auf Eis inkubiert. Die Nachweisantikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt (Maus anti-His6 IgG: 1 ng/µl, Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC-Konjugat: 900 ng/µl). Nach jedem Färbeschritt folgten wiederholte Waschschriffe wie oben beschrieben. Als Kontrollen dienten nicht-bindende Primärantikörper (Isotypenkontrollen) oder das Nachweissystem ohne Primärantikörper. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Pro verwendeter Zelllinie wurde ein Ansatz der Färbeprozedur unterzogen, ohne aber den Puffern Antikörper bzw. Fusionsproteine zuzugeben (*mock*-Ansatz). Dieser *mock*-Ansatz war somit der gleichen Färbeprozedur unterworfen, ohne die Zellen zu färben.

Die Analyse und Auswertung erfolgte am Cytomics FC500-Gerät (Beckman Coulter). Dem *mock*-Ansatz wurden 5 µl Propidiumiodid-Lösung zugegeben, wodurch tote und nekrotische Zellen im Fluoreszenzkanal 3 (FL-3) sichtbar wurden. Im *Forward Scatter* vs. *Sideward Scatter*-Plot wurden die lebenden Zellen markiert (*Gating*) und diese Markierung für die Auswertung aller weiteren Ansätze angewandt. Es wurden pro Ansatz 5000 – 10.000 lebende Zellen hinsichtlich ihrer FITC-Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1) analysiert. Die Intensitätsverteilungen von Proben wurden mit denen der Negativkontrollen verglichen, um die Intensität der Zellfärbung zu bestimmen. Zur Auswertung wurde der MFI-Wert (*mean fluorescence intensity*) der Fluoreszenzverteilung herangezogen.

#### **2.2.6.10 Zellbasierter NF-kappaB-Reporterassay**

HEK293 Luc-Zellen (Dr. Reinhard Voll, Universitätsklinikum Erlangen) enthalten stabil transfiziert ein Luciferase-Gen unter Kontrolle eines NF-kappaB-abhängigen Promotors. Je 5000 – 7500 solcher Zellen wurden mit je 100 µl Medium in eine Vertiefung einer 96Well-Zellkulturplatte überführt und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden in Triplikaten je 100 µl von Fusionsproteinen bzw. Kontrollen zugegeben und für 1 h im Zellinkubator weiterinkubiert. Danach wurden weitere 100 µl Medium mit 10 ng humanem Interleukin 1-beta zur Aktivierung des NF-kappaB-Signalweges zugegeben und die Zellen für weitere 3 h inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde der gesamte Überstand abgenommen und die Zellen bei RT für 20 min mit Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde das Luciferase Assay System-Kit (Promega) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. In einer weißen 96Well-Platte wurden mit einer 12-Kanal-Pipette parallel in je 12 Vertiefungen je 60 µl Luciferase-Substrat mit 20 µl Zelllysate vermischt und sofort im Lumineszenz-Detektor (Tecan ULTRA) parallel vermessen. Als interner Standard jeder Messreihe wurden IL1-beta-aktivierte Zellen verwendet, die nur mit Puffer (ohne Fusionsproteine) inkubiert worden waren. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der NF-kappaB-Inhibition wurden TAT-NBD-Peptide (vgl. 2.1.16) eingesetzt. Die Peptide wurden auf eine Endkonzentration von 100 mM in DMSO gelöst und für den Assay auf die zu testende Konzentration in PBS verdünnt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Proteinproduktion in Insektenzellen

Zur Produktion der Zielproteine in Insektenzellen wurden mit Hilfe des „Bac-to-Bac“-Systems (Invitrogen) rekombinante Baculoviren generiert. Mit den Baculoviren wurden Sf9- bzw. Tn5-Zellen infiziert. Die infizierten Zellen produzierten das Zielprotein, bevor sie nach 72 – 96 h lysierten.

#### 3.1.1 Transfervektoren für die Generierung rekombinanter Baculoviren

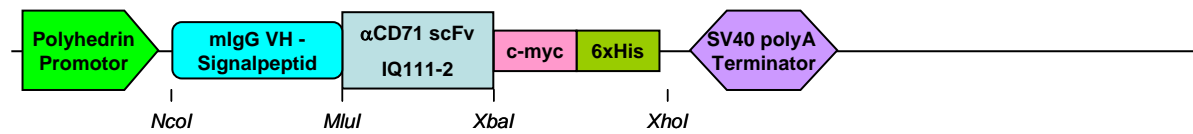
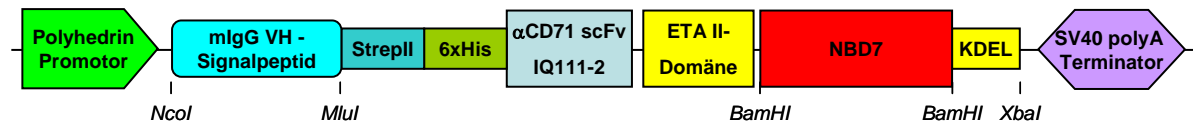
Als Transfervektor wurde der auf dem Vektor pFastBac1 basierende Vektor pFastBac Ig-cMet verwendet. Das Gen des Zielproteins wurde in diesem Plasmid in den 3'-Bereich hinter einem baculoviralen Polyhedrin-Promotor kloniert, unter dessen Kontrolle das Zielgen in den Insektenzellen exprimiert wird. Ein N-terminales Signalpeptid einer variablen Domäne der schweren Kette eines murinen IgGs führt zur Sekretion des produzierten Proteins aus den Insektenzellen. Hierzu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *XhoI* bzw. *XbaI* geschnitten und das Vektorgerüst isoliert.

Über eine PCR mit den Primern aTFRscFv-MluI-fwd und pICZ-Myc-His-Xho-rev auf der Plasmid-Vorlage pICZalpha A aTFR scFv wurde ein DNS-Fragment amplifiziert, das für den anti-CD71 scFv-Klon IQ111-2 kodierte. Dieses Fragment wurde mit den Enzymen *MluI* und *XhoI* geschnitten und mit dem Vektorgerüst ligiert. Das vollständige Proteinkonstrukt (Abb. 3.1-1 A) besteht aus dem scFv mit zwei C-terminalen Tags (c-myc-Tag und 6xHis-Tag).

Zur Klonierung des vollständigen *Ligand Sneaking*-Konstruktes LS7-NBDsII wurde das Gen mit Hilfe der Primer Strep-Tag-MluI-fwd und NBDsII-KDEL-XbaI-rev über eine PCR auf der Plasmid-Vorlage pOPE101 LS7-NBDsII (Broders, 2004) amplifiziert, das DNS-Fragment mit den Enzymen *MluI* und *XbaI* restringiert und mit dem vorbereiteten Vektorgerüst ligiert. Der entstandene Vektor kodiert für ein Fusionsprotein aus anti-CD71 scFv IQ111-2, ETA II-Domäne und NBD-Variante NBD7 mit C-terminaler ER-Retentionssequenz (KDEL) und N-terminalen Tags (Strep-Tag II und 6xHis-Tag) hinter dem Signalpeptid (Abb. 3.1-1 B).

Positive Ligationsklone wurden jeweils durch eine Kolonie-PCR mit den Primern pFastBac-fwd und pFastBac-rev anhand der Größe des Amplifikates identifiziert und die korrekte DNS-Sequenz per Sequenzierung unter Nutzung der Primer pFastBac-fwd, pFastBac-rev, aTFR-VH/F1, aTFR-VL/F1, aTFR-VL/R und der jeweiligen Klonierungsprimer bestätigt. Für das LS7-NBDsII-Konstrukt wurden zusätzlich die Primer CM 7, CM 8, CM 9 und CM 10 zur Sequenzierung eingesetzt.



**A) pFastBac IQ111-2 scFv****B) pFastBac LS7-NBDsII****Abb. 3.1-1: Konstrukte im Transfervektor pFastBac1****3.1.2 Generierung rekombinanter Baculoviren**

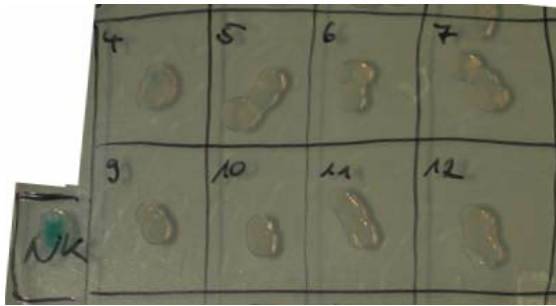
Mit den klonierten Transfervektoren wurden *E. coli*-DH10-Bac-Zellen transformiert. Diese Zellen beinhalten ein Baculovirus-Genom in Form eines Bacmids. Zusätzlich tragen sie ein Hilfsplasmid, das für eine Rekombinase kodiert. Die Rekombinase katalysiert die Integration der Genkassette aus Promotor und Zielgen aus dem Transfervektor durch ein sequenzspezifisches Rekombinationsereignis in das Bacmid. Es wurden Klone isoliert, bei denen diese Integration erfolgreich stattgefunden hatte. Dazu wurden die Transformationsansätze auf X-Gal-Agarplatten plattiert, die eine Blau-Weiß-Selektion der Kolonien ermöglichten. Vom Bacmid wird in *E. coli* ein LacZ-alpha-Gen exprimiert, welches eine Deletion im LacZ-Gen des Bakterienstammes komplementiert. Die Zellen spalten das X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Bei einem erfolgreichen Rekombinationsereignis wird das LacZ-alpha-Gen im Bacmid unterbrochen, die Zellen können keinen blauen Farbstoff mehr herstellen und die Kolonien bleiben auf einer X-Gal enthaltenden Agarplatte weiß.

Auf der Transformationsplatte weiß erscheinende Einzelklone wurden auf neue Platten mit und ohne Ampicillin abgeimpft. Nur Klone, die auf der Platte mit Ampicillin nicht wuchsen, waren geeignet für die Isolation der Bacmid-DNS, da sie den Transfervektor, der ihnen die Ampicillin-Resistenz verleiht, im Zuge der Integration der Expressionskassette in das Bacmid verloren hatten (Abb. 3.1-2).

Die Homogenität der Bacmid-DNS wurde über eine PCR kontrolliert (Abb. 3.1-3 A). Aus derart überprüften Klonen wurde die Bacmid-DNS isoliert und zur Transfektion von Sf9-Insektenzellen verwendet. Die transfizierten Insektenzellen produzierten rekombinante Baculoviren, deren Titer gemessen (Abb. 3.1-3 B) und anschließend amplifiziert wurde.

Die Abbildungen 3.1-2 und 3.1-3 fassen die wesentlichen Schritte zur Generierung der rekombinanten Baculoviren zur Produktion des anti-CD71 scFv-Klon IQ111-2 zusammen. Für das Konstrukt zur Produktion des kompletten *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins LS7-NBDsII wurden die Schritte analog durchgeführt.

**A) Agarplatte ohne Ampicillin**



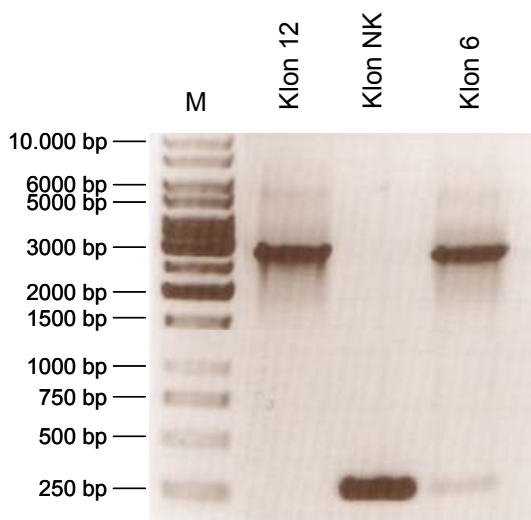
**B) Agarplatte mit Ampicillin**



**Abb. 3.1-2: Schritte zur Generierung von rekombinanten Baculoviren**

**Agarplatten ohne Ampicillin (A) und mit Ampicillin (B)** mit Klonen von *E. coli*-DH10-Bac-Zellen. Bei Klon 12 wurde das Zielgen erfolgreich in das Bacmid inseriert und der Transfervektor verloren, daher wuchs der Klon auf einer Platte mit Ampicillin nicht. Bei Klon 6 enthielt ein Teil der Zellen den Transfervektor noch, der diesen Zellen das Wachstum auf der Platte mit Ampicillin erlaubte. NK: Negativkontrolle (schon auf Transformationsplatte blaue Kolonie)

**A) PCR-Analyse von Klonen**



**B) Plaque Assay**



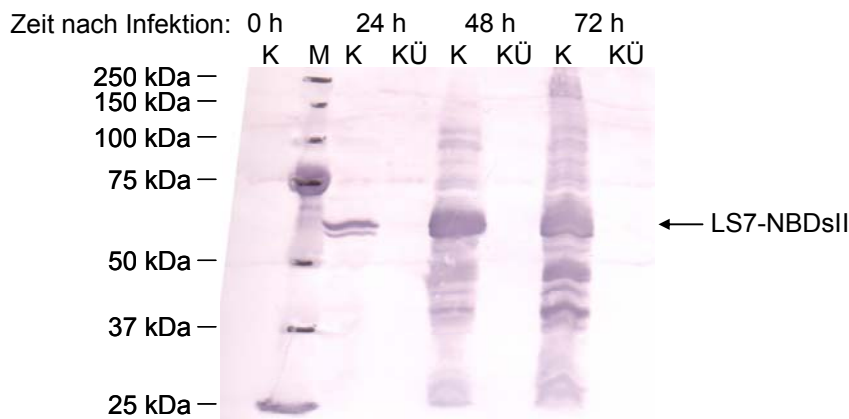
**Abb. 3.1-3: Schritte zur Generierung von rekombinanten Baculoviren**

**A) Agarose-Gel nach PCR** auf der Vorlage isolierter Bacmid-DNS mit den Primern M13-(-40)-fwd und M13-rev. Die Bande bei 3000 bp für Klon 12 zeigt eine erfolgreiche Insertion des Zielgens an, die Bande bei 250 bp für Klon NK (Negativkontrolle) zeigt die nicht-rekombinierte Bacmid-DNS an. Bei Klon 6 sind sowohl bei 3000 bp als auch bei 250 bp Banden erkennbar, was auf eine heterogene Bacmid-DNS hinweist. M: Größenstandard. **B) Vertiefung einer 6Well-Platte nach Plaque-Assay.** Die gebildeten rekombinanten Baculoviren verursachen helle Plaques in der mit Agarose überschichteten Sf9-Insektenzellschicht. Aus der Anzahl der Plaques lässt sich der Titer infektiöser Baculovirus-Partikel errechnen.

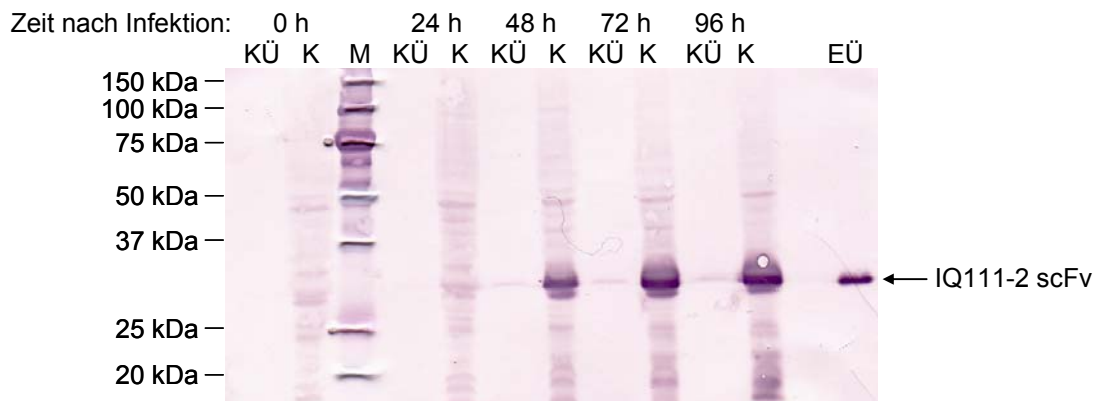
### 3.1.3 Produktion der Zielproteine in Insektenzellen

Sf9-Zellen wurden in Flüssigkultur mit rekombinanten Baculoviren infiziert und über 72 – 96 h kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommene Proben wurden im Western Blot mit anschließender Immunfärbung analysiert (Abb. 3.1-4). In den Proben der Gesamtkultur konnte eine mit der Zeit ansteigende Menge an Zielprotein detektiert werden, wohingegen im Medienüberstand nur geringe Mengen detektiert werden konnten, und dies auch nur bei der Produktion des anti-CD71 scFvs, nicht aber beim LS7-NBDsII-Protein.

#### A) Zeitreihe zur Produktion des Fusionsproteins LS7-NBDsII in Insektenzellen



#### B) Zeitreihe zur Produktion des anti-CD71 scFvs IQ111-2 in Insektenzellen



**Abb. 3.1-4: Proteinproduktion in Sf9-Insektenzellen**

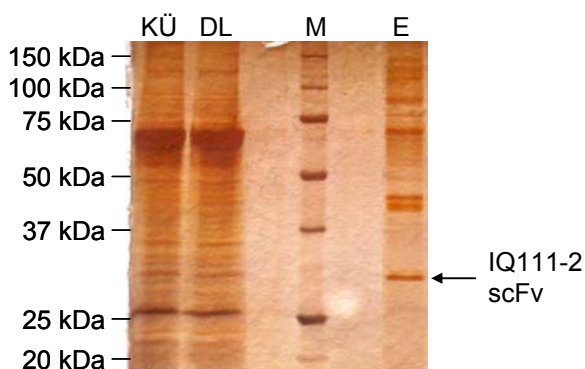
**A und B): Western Blots** nach Immunfärbung mit Zeitreihe zur Produktion der Zielproteine. Zu mehreren Zeitpunkten wurden Proben der Gesamtkultur (mit Zellen) und des Kulturüberstandes (ohne Zellen) im Western Blot für die Produktion des Fusionsproteins LS7-NBDsII (A) und des anti-CD71 scFvs (B) analysiert. Nachweissysteme: A): Maus anti-StrepTag IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP; B): Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. K: Gesamtkultur. KÜ: zellfreier Kulturüberstand. EÜ: Elutionsfraktion nach Aufreinigung des Materials aus dem Kulturüberstand. M: Größenstandard. Die Banden der Zielproteine sind mit Pfeilen bezeichnet.

Zellzahl und Vitalität blieben bis 72 h nach Infektion ungefähr konstant, nach 96 h wurden deutlich weniger Zellen gezählt und auch die Vitalität fiel drastisch (Daten nicht gezeigt). Beides deutet auf eine Zelllyse. Dies entspricht der Erwartung, da die Baculoviren zur Lyse von Insektenzellen führen.

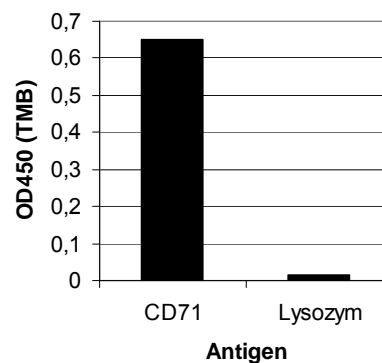
Die verbleibenden Zellen wurden am Ende der Produktion abzentrifugiert und lysiert. Das Zielprotein wurde sowohl aus dem Zelllysats als auch aus dem Medienüberstand per IMAC an der FPLC-Anlage ÄKTAprime aufgereinigt. Bei der Elution über einen Imidazol-Gradienten wurde das Zielprotein schon bei geringen Konzentrationen von weniger als 50 mM Imidazol eluiert. Die Elutionsfraktionen enthielten dementsprechend noch eine große Menge an kontaminierenden Proteinen (Abb. 3.1-5 A).

Geringe Mengen des anti-CD71 scFvs wurden sowohl aus dem Zelllysats als auch aus dem Medienüberstand aufgereinigt. Für das LS7-NBDsII-Fusionsprotein konnte eine geringe Menge an Protein aus dem Medienüberstand, nicht aber aus dem Zelllysats gewonnen werden. Das Material wurde hier während der Aufarbeitung vermutlich degradiert, mittels Western Blot mit folgender Immunfärbung ließ sich kein Zielprotein detektieren (Daten nicht gezeigt). Von allen aufgereinigten Proteinfractionen zeigte nur die Fraktion des scFvs aus dem Medienüberstand Aktivität und auch Spezifität im ELISA (Abb. 3.1-5 B).

#### A) SDS-Gel zur Aufreinigung des scFvs



#### B) ELISA zur Spezifität des scFvs



#### Abb. 3.1-5: Aufreinigung und Spezifität des anti-CD71 scFvs aus Insektenzellproduktion

**A) SDS-Gel** nach Silberfärbung mit Proben aus der Aufreinigung des anti-CD71 scFvs aus dem Kulturüberstand. KÜ: zellfreier Kulturüberstand. DL: Durchlauf. E: Elutionsfraktion nach Aufreinigung des Materials aus dem Kulturüberstand. M: Größenstandard. **B) ELISA** auf dem Zielantigen CD71 und dem Kontrollantigen Lysozym mit der Elutionsfraktion nach Aufreinigung des anti-CD71 scFvs aus dem Kulturüberstand. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

### 3.2 Produktion durch Sekretion ins Periplasma von *E. coli*

Zur Produktion von Proteinen in *E. coli* XL1-blue MRF' wurden kompetente Zellen mit pOPE101-Vektoren transformiert. Im Vektor pOPE101 liegt das Zielgen in Fusion mit der für ein PelB-Signalpeptid kodierenden Sequenz vor. Das Signalpeptid bewirkt, dass das Protein mittels des Sec-Transportmechanismus vom Zytoplasma durch die Zytoplasmamembran in das bakterielle Periplasma transportiert wird, in dessen oxidativem Milieu sich die Proteinfaltung und die Ausbildung von

Disulfidbrücken vollziehen (Fekkes und Driessen, 1999; Choi und Lee, 2004). Das Signalpeptid wird während des Sekretionsvorganges proteolytisch vom Protein abgespalten.

### 3.2.1 LS-Konstruktvarianten auf Basis des anti-CD71 scFvs IQ111-2

Beim *Ligand Sneaking*-Fusionsprotein soll die Fähigkeit der ETA II-Domäne zur Vermittlung der Translokation des C-terminalen Proteinteils aus dem Endosom in das Zytoplasma genutzt werden. Um den Verbleib des C-terminalen Proteinteils später auch über immunbiologische Nachweismethoden verfolgen zu können, wurde eine Variante des LS7-Konstruktes ohne N-terminale Tags, jedoch mit einem 6xHis-Tag vor dem C-terminalen ER-Retentionssignal kloniert.

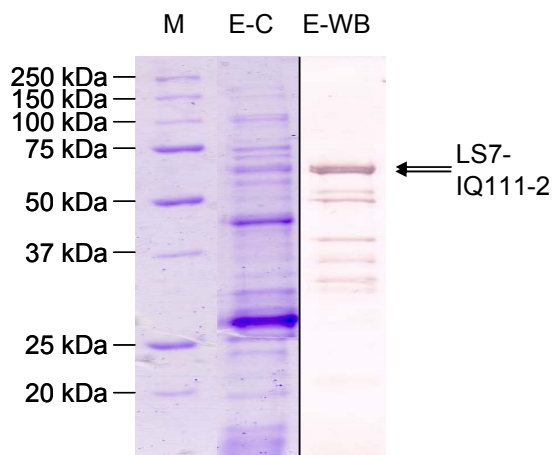
Dafür wurde mit den Primern PelB-NcoI-aTFR-fwd und NBDsII-HIS-KDEL-XbaI-rev mit einer Taq-Polymerase aus dem Vektor pOPE101 LS7-NBDsII (Broders, 2004) ein PCR-Produkt amplifiziert, welches mit Hilfe des TOPO-TA Cloning-Kit (Invitrogen) in den Vektor pCR2.1-TOPO inseriert wurde. Aus diesem wurde es durch Restriktion mit NcoI und XbaI ausgeschnitten und mit dem Vektorgerüst des mit den gleichen Enzymen geschnittenen Plasmids pOPE101 215(yol) ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde als pOPE101 LS7-IQ111-2 bezeichnet (Abb. 3.2-2 B). Das Fusionsprotein ließ sich nur mit sehr geringen Ausbeuten produzieren und über den 6xHis-Tag nicht zufriedenstellend aufreinigen (Abb. 3.2-1). Um die Ausbeute an sekretorisch produziertem LS7-IQ111-2-Fusionsprotein zu erhöhen, wurde das Genfragment unter Kontrolle eines schwächeren Wildtyp-LacZ-Promotors exprimiert, um die Produktionsrate zu verringern und den Sekretionsapparat zu entlasten. Auch wurde die Auswirkung der Verwendung eines DsbA-Signalpeptids (SRP-Transportmechanismus) anstelle des PelB-Signalpeptids (Sec-Transportmechanismus) auf die Ausbeute untersucht. Weiterhin wurde der Effekt der Koexpression von periplasmatischen Chaperonen der Dsb-Familie (Kurokawa *et al.*, 2001) analysiert. Keine dieser Maßnahmen führte zu einer nennenswerten Ausbeutesteigerung (Daten nicht gezeigt).

Auf Grundlage des Konstruktes pOPE101 LS7-IQ111-2 wurde eine Konstruktvariante kloniert, die statt der langen NBD-Variante NBD7 eine kurze Variante, NBD5, enthält. Dazu wurde mit den Primern CM 9 und MH-pOPE-r2 auf der Grundlage des Vektors pHOG21 LS5-NBDsII (Broders, 2004) ein PCR-Fragment amplifiziert, das für die kurze NBD-Variante kodierte. Aus dem Konstrukt pOPE101 LS7-IQ111-2 wurde mittels Verdau mit dem Enzym *Bam*HI die für die Variante NBD7 kodierende Sequenz ausgeschnitten und das mit dem gleichen Enzym geschnittene PCR-Fragment einkloniert. Das entstandene Konstrukt wurde als LS5-IQ111-2 bezeichnet (Abb. 3.2-2 C). Um zu analysieren, welche Teile des Fusionsproteins für die geringe Ausbeute bei der Sekretion ins Periplasma verantwortlich waren, wurden Konstruktvarianten erstellt, bei denen die ETA II-Domäne deletiert wurde. Dazu wurde zunächst der Vektor pOPE101 XP mit den Enzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten. Ein aus den hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotiden BVO 51 und BVO 52 bestehendes DNS-Fragment wurde in das Vektorgerüst kloniert. Dieses DNS-Fragment kodiert für einen 6xHis-Tag und ein STOP-Codon. Der neue Vektor wurde als pOPE101 ExpressHis bezeichnet. Mit den Primern BVO 28 und BVO 50 wurde dann durch eine PCR auf der Grundlage des Vektors

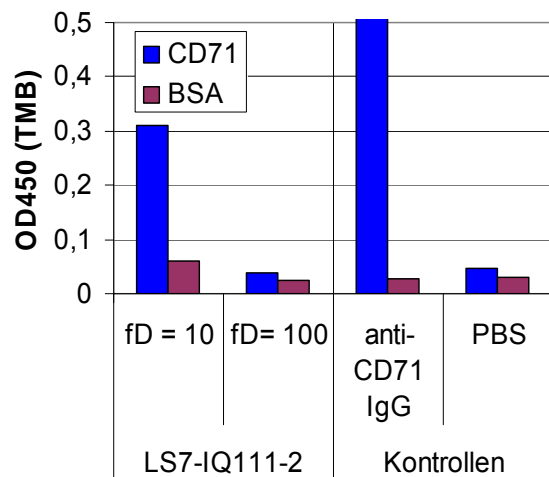
pOPE101 IQ111-2 scFv (Abb. 3.2-2 D) ein DNS-Fragment erzeugt, welches die kodierende Sequenz für den anti-CD71 scFv IQ111-2 enthält und über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XbaI* in den neuen Vektor pOPE101 ExpressHis einkloniert wurde. Das entstandene Konstrukt wurde als pOPE101 IQ111-2 scFv-HIS (Abb. 3.2-2 E) bezeichnet. In diesen Vektor wurden nun die Sequenzen für die beiden NBD-Varianten NBD5 und NBD7 zwischen den scFv und den 6xHis-Tag kloniert. Die jeweiligen DNS-Fragmente wurden durch PCR mit den Primern MH-pOPE-r2 und CM 9 mit den Vorlagen pOPE101 LS7-IQ111-2 bzw. LS5-IQ111-2 amplifiziert, mit dem Enzym *BamHI* geschnitten und in den ebenfalls mit dem Enzym *BamHI* geschnittenen Vektor pOPE101 IQ111-2 scFv-HIS einkloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden als pOPE101 IQ111-2-NBD7 bzw. pOPE101 IQ111-2-NBD5 bezeichnet (Abb. 3.2-2 F und G).

Positive Ligationsklone wurden jeweils über Kolonie-PCR identifiziert und über Sequenzierung mit Hilfe der Primer pOPE-Seq-II-rev, aTFR-VH/F1, BVO 08, BVO 28 und PelB-Leader-3'-rev das Vorliegen der korrekten Sequenz bestätigt.

#### A) Produktion und Aufreinigung



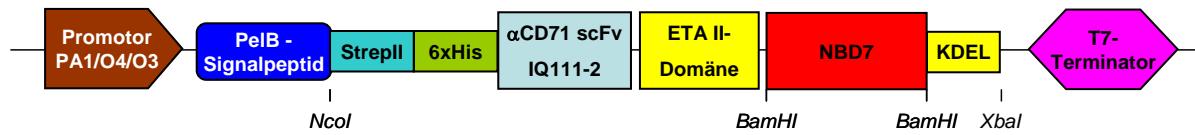
#### B) Spezifität im Antigen-ELISA



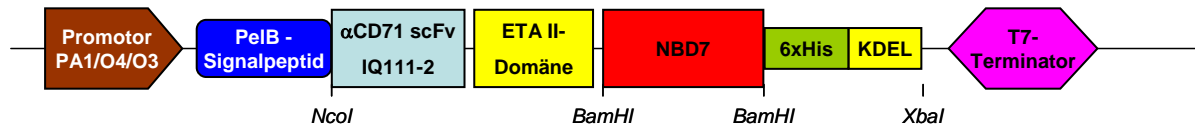
**Abb. 3.2-1: Produktion, Aufreinigung und Spezifität des LS-Fusionsproteins LS7-IQ111-2**

**A) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung und WesternBlot nach Immunfärbung.** Das LS-Fusionsprotein LS7-IQ111-2 wurde in einer 4 l-Kultur in Schüttelkolben produziert. Das Zielprotein wurde über den 6xHis-Tag an der FPLC-Anlage ÄKTaprime aus der dialysierten periplasmatischen Proteinpräparation aufgereinigt. Das Zielprotein wurde bei der Konzentration von 50 mM Imidazol zusammen mit vielen Kontaminanten eluiert, die Elutionsfraktion wurde aufkonzentriert. Die detektierte Doppelbande wird vermutlich durch beim Transport prozessiertes und nicht-prozessiertes Protein gebildet. M: Größenstandard. E-C: konzentrierte Elutionsfraktion im Coomassie-gefärbten SDS-Gel. E-WB: konzentrierte Elutionsfraktion im immungefärbten Western Blot. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. **B) Antigen-ELISA** mit der konzentrierten Elutionsfraktion aus der IMAC-Aufreinigung. fD: Verdünnungsfaktor. Nachweissystem für das LS-Fusionsprotein und die PBS-Negativkontrolle: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-HRP; für die Positivkontrolle (OD450 = 3,288): Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

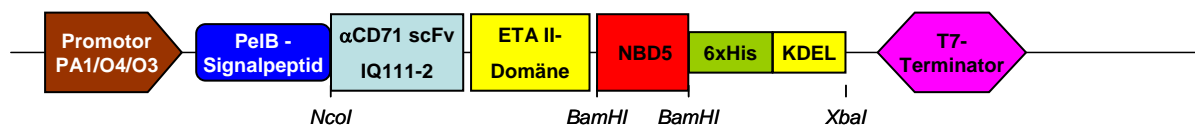
A) pOPE101 LS7-NBDsII (Broders, 2004)



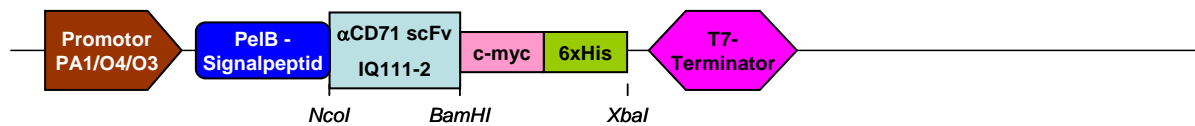
B) pOPE101 LS7-IQ111-2



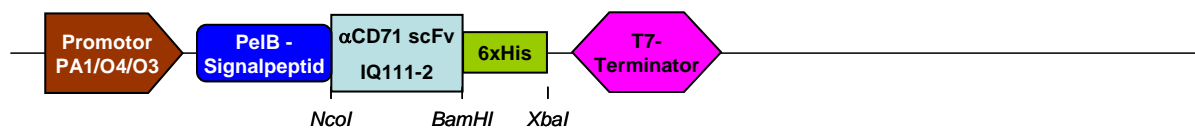
C) pOPE101 LS5-IQ111-2



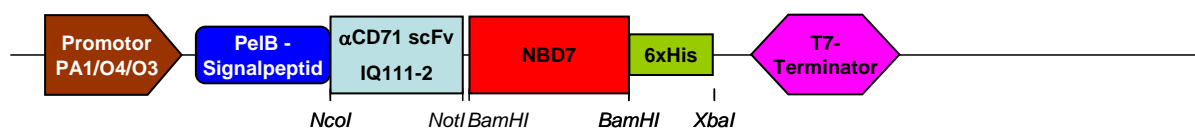
D) pOPE101 IQ111-2 scFv



E) pOPE101 IQ111-2 scFv-HIS



F) pOPE101 IQ111-2-NBD7



G) pOPE101 IQ111-2-NBD5

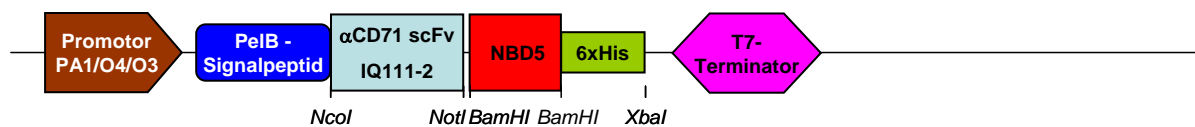






















Abb. 3.2-2: Konstrukte basierend auf dem anti-CD71 scFv IQ111-2 im Vektor pOPE101



### 3.2.2 Verteilung von *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen zwischen Membran- und Zytoplasmafraktion

Die Ausbeute der periplasmatischen Proteinpräparationen waren sowohl bei der Produktion des LS7-NBDsII-Fusionsproteins (N-terminale Tags) als auch bei den LS7-IQ111-2- bzw. LS5-IQ111-2-Fusionsproteinen extrem gering. Es wurde daher vermutet, dass die *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine das bakterielle Periplasma nicht erreichen. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Proteine im Zuge des Transportprozesses eine Interaktion mit der Membran eingehen und sich in ihr festsetzen. Dazu wurden die Proteine in Schüttelkolben produziert, aus gleichen Zellmengen die lösliche Proteinfraction des Zelllysates gewonnen und diese in die Membranfraktion und die zytoplasmatische Fraktion aufgeteilt. Auf zwei PVDF-Membranen wurden im Western Blot mit anschließender Immunfärbung qualitativ die lösliche Proteinfraction zum einen mit der Fraktion der Zellmembranen und zum anderen mit der Fraktion der zytoplasmatischen Proteine verglichen, um zu ermitteln, welcher Anteil des Zielproteins aus der löslichen Proteinfraction sich in der Membranfraktion und welcher Anteil sich in der zytoplasmatischen Fraktion befand (Abb. 3.2-3).

| Konstrukt    | Protein in  |   |  | Protein in   |   |
|--------------|---|---|--|--|---|
|              | löslicher Fraktion  | Membran-fraktion  |  | löslicher Fraktion   | Zytoplasma-fraktion   |
| IQ111-2 scFv |  |  |  |  |  |
| IQ111-2-NBD7 |  |  |  |  |  |
| IQ111-2-NBD5 |  |  |  |  |  |
| LS7-IQ111-2  |  |  |  |  |  |
| LS5-IQ111-2  |  |  |  |  |  |

**Abb. 3.2-3: Verteilung der LS-Fusionsproteine zwischen Membran- und Zytoplasmafraktion**

Die LS-Fusionsproteine auf Basis des anti-CD71 scFvs IQ111-2 wurden produziert und von jeweils gleichen Zellmengen die lösliche und die unlösliche Proteinfraction gewonnen. Die lösliche Proteinfraction wurde in eine Membranfraktion und eine Zytoplasmafraktion geteilt. In zwei Western Blots mit Immunfärbung wurden dann jeweils äquivalente Proben einer dieser Teilfraktionen ihrer löslichen Ausgangsfraction gegenübergestellt. Durch den Vergleich der Bandenstärken kann auf die Verteilung des Zielproteins zwischen den beiden Teilfraktionen geschlossen werden. Die obere der jeweils deutlich sichtbaren Doppelbanden stellt dabei wahrscheinlich die nicht-prozessierte Form des Zielproteins mit N-terminalem PelB-Signalpeptid dar, die untere das schon prozessierte Zielprotein ohne das Peptid. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP.



Der Vergleich der Bandenstärken zeigt, dass der größte Teil des löslichen Zielproteins unabhängig vom Konstrukt jeweils in der Membranfraktion zu finden war, während nur wenig Zielprotein in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden konnte. Unter der Annahme, dass es sich bei der oberen der beiden Banden im Western Blot um das noch unprozessierte Zielprotein mit PelB-Signalpeptid handelt, wurde stets die gleiche oder sogar eine größere Menge an prozessiertem Protein ohne PelB-Peptid im Vergleich zur Menge an unprozessiertem Protein in der Membranfraktion gefunden. Für das Protein IQ111-2-NBD5 war die im Western Blot sichtbare Bande deutlich schwächer als die Banden der anderen Konstrukte. (Das Protein wird vermutlich abgebaut, siehe dazu Kapitel 3.2.9).

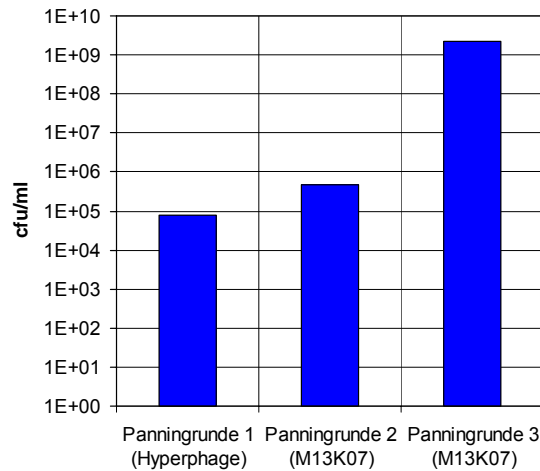
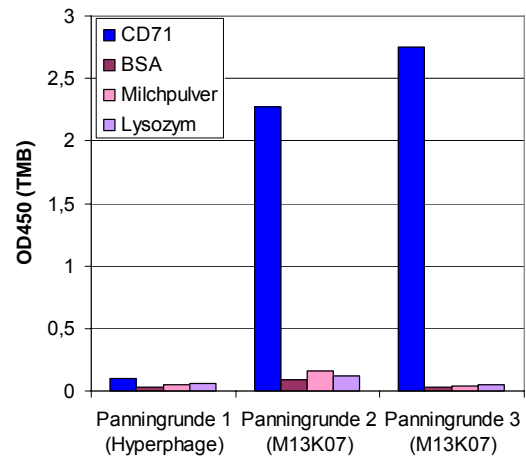
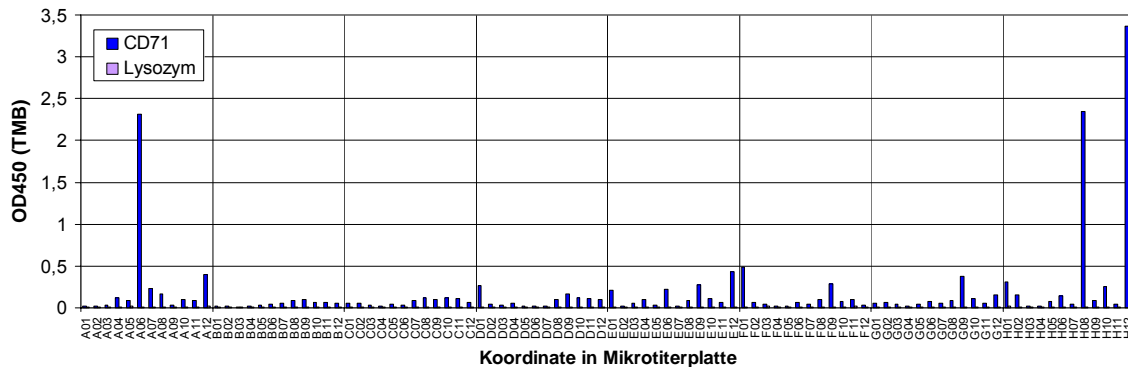
### 3.2.3 Isolation neuer anti-CD71 scFvs mittels Phagendisplay

Da sich der anti-CD71 scFv IQ111-2 und alle von ihm abgeleiteten Fusionsproteine nicht erfolgreich von *E. coli* ins Periplasma sekretieren ließen, wurden aus einer scFv-Phagendisplay-Bibliothek neue gegen CD71 gerichtete Antikörperfragmente isoliert.

Für die erste *Panning*-Runde wurden die beiden Teilbibliotheken „Tomlinson I“ und „Tomlinson J“ getrennt voneinander mit Hilfe des Helferphagen Hyperphage (Rondot *et al.*, 2001) verpackt (polyvalentes Display) und dann gemeinsam eingesetzt. Für eine zweite und dritte *Panning*-Runde wurde M13K07 (Vieira und Messing, 1987) als Helferphage verwendet (monovalentes Display). Die eluierten Phagen wurden titriert, wobei der Phagentiter von Runde zu Runde anstieg (Abb. 3.2-4 A). Die Anreicherung von anti-CD71 scFv-Phagen wurde mittels ELISA überprüft (Abb. 3.2-4 B). Die spezifische Bindung der scFv-Phagen nahm von *Panning*-Runde 1 zu *Panning*-Runde 3 zu. Eine unspezifische Bindung an Kontrollantigene war nicht nachweisbar.

Nach der dritten *Panning*-Runde wurden von Einzelklonen lösliche scFv-Antikörperfragmente in 96Well-Platten produziert und die Medienüberstände nach der Produktion im ELISA getestet (vgl. Abb. 3.2-4 C). Dabei wurden mehrere Klone identifiziert, deren Signal im ELISA bei Werten von OD450 = 0,3 – 0,5 lagen. Für die Klone in den Vertiefungen A6 und H8 wurden überdurchschnittlich hohe Signale gefunden. Die scFv-Gene im Phagemid der unterschiedlichen Klone wurden mit Hilfe der Primer MK-PelB-f und MK-myc-r sequenziert und dabei festgestellt, dass die Klone in den Vertiefungen A6 und H8 identisch waren. Da dieser Klon im ELISA die mit Abstand besten Signale lieferte, wurde er weiter charakterisiert und als scFv in den *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen eingeführt. Der Klon wird im Folgenden als anti-CD71 scFv TOM A6 bezeichnet.

Über die Schnittstellen *NcoI* und *NotI* wurde das für den scFv kodierende DNS-Fragment aus dem Phagemid pIT2 ausgeschnitten und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Gerüst des Vektors pOPE101 XP einligiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung unter Nutzung der Primer pOPE-Seq-II-fwd und pOPE-Seq-II-rev verifiziert.

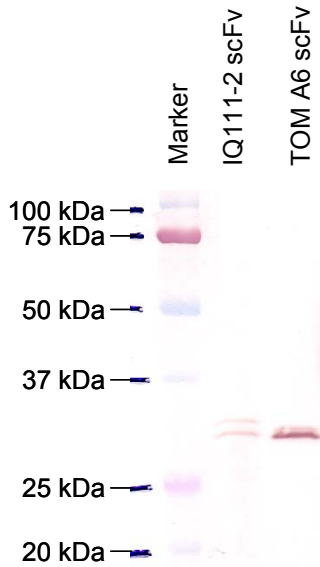
**A) Phagentiter****B) Polyklonaler Phagen-ELISA****C) ELISA mit monoklonalen, löslichen scFv-Antikörperfragmenten****Abb. 3.2-4: Isolation von scFv-Antikörperfragmenten aus der Tomlinson-Bibliothek**

**A) Phagentiter** nach der Elution am Ende jeder *Panning*-Runde. **B) Polyklonaler Phagen-ELISA** zur Kontrolle der spezifischen Anreicherung von CD71-bindenden scFv-Antikörperphagen. Jede Vertiefung wurde mit 300 ng CD71 bzw. 1 µg Kontrollantigen beschichtet. Pro Vertiefung wurden  $7 \times 10^9$  Phagen aus dem Amplifikationsschritt vor der jeweils folgenden *Panning*-Runde eingesetzt. Der Nachweis der Phagen geschah über Maus anti-M13-HRP. **C) ELISA** mit Medienüberständen von 94 monoklonalen, löslichen scFv-Antikörperfragmenten nach der dritten *Panning*-Runde aus einer Produktion in Mikrotiterplatten. In einer 96Well-Platte wurde jede Vertiefung mit 200 ng CD71 beschichtet. Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen wurden die Vertiefungen einer zweiten Platte mit je 1 µg Lysozym beschichtet. Es wurden je 20 µl Medienüberstand als Probe eingesetzt. In Vertiefung H12 wurde Maus anti-CD71 IgG als Positivkontrolle eingesetzt. In Vertiefung A1 wurde Medienüberstand von nicht angeimpftem Medium als Negativkontrolle verwendet. Nachweissystem für die scFvs: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-HRP; für die Positivkontrolle: Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

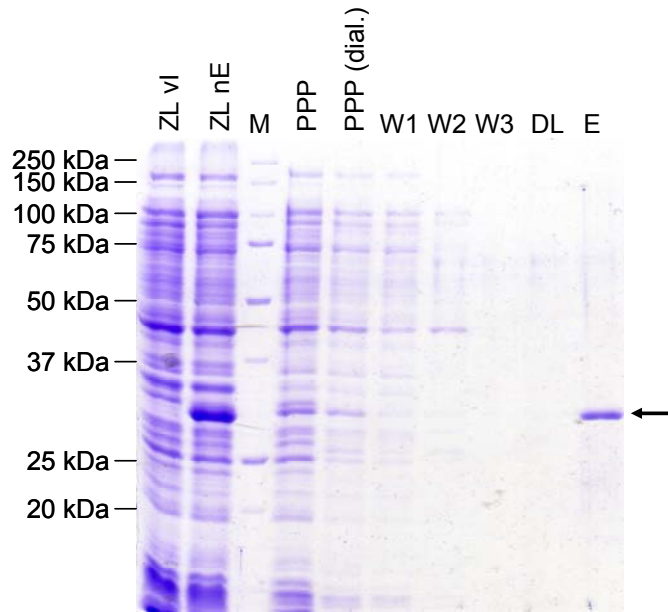
**3.2.4 Charakterisierung des anti-CD71 scFv TOM A6**

Nach der Klonierung des anti-CD71 scFv TOM A6 in den Expressionsvektor pOPE101 wurde das Zielprotein im Schüttelkolben produziert. Dabei zeigte sich, dass die Ausbeute an scFv beim Klon TOM A6 die des Klons IQ1111-2 um ein Vielfaches übertraf (Abb. 3.2-5 A).

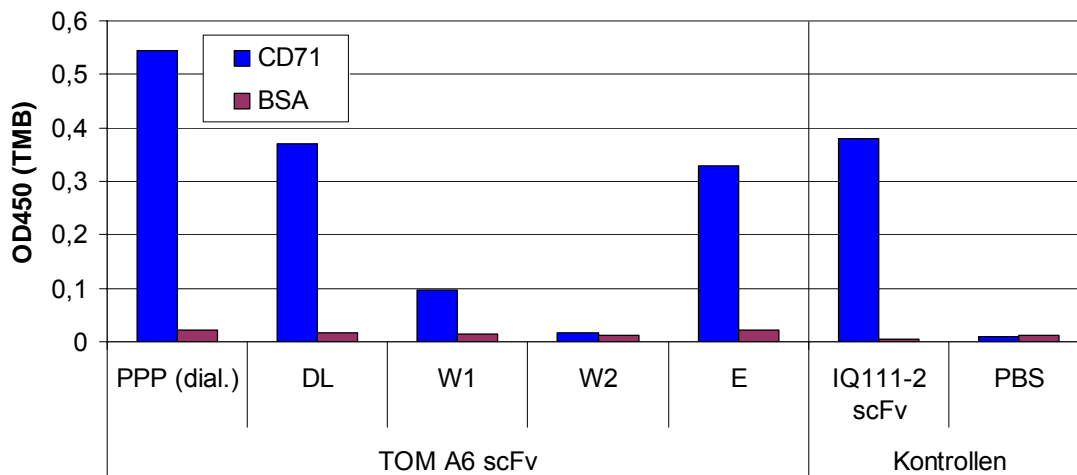
**A) Vergleich der Ausbeute von IQ111-2 scFv und TOM A6 scFv**



**B) Aufreinigung des TOM A6 scFv**



**C) Antigen-ELISA**



**Abb. 3.2-5: Produktion des anti-CD71 scFv TOM A6**

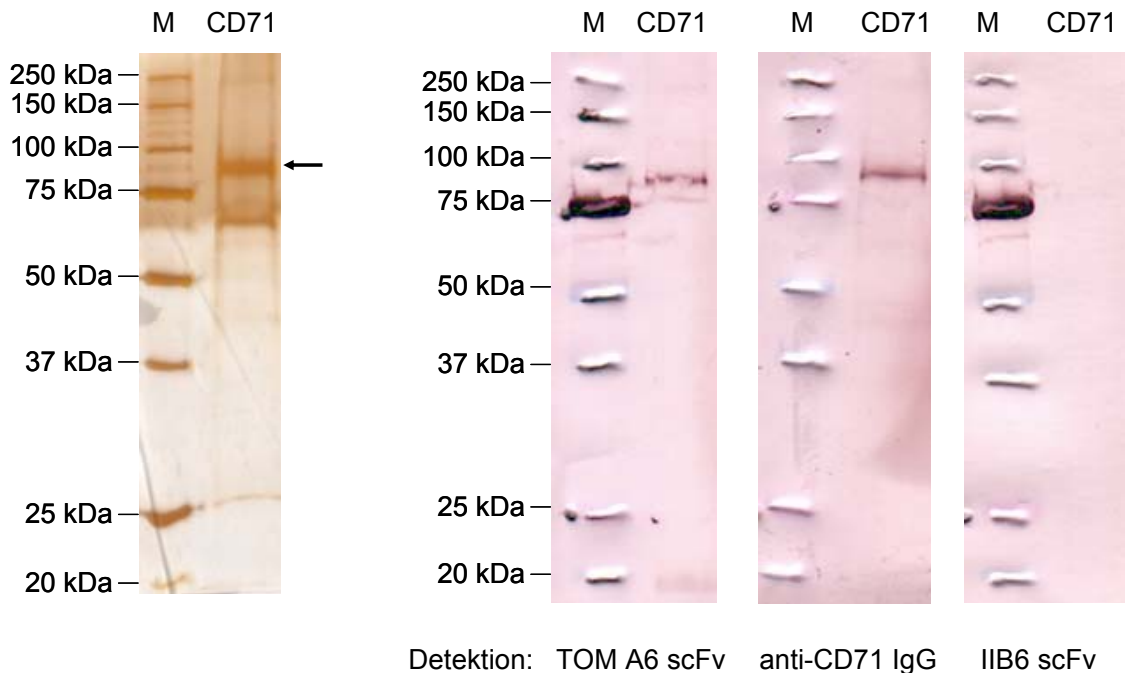
**A) Western Blot** nach Immunfärbung zweier auf die gleiche Zelldichte (OD600) normierter periplasmatischer Proteinpräparationen der anti-CD71 scFv-Klone IQ111-2 und TOM A6. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. **B) SDS-Gel** zum Aufreinigungsverlauf des anti-CD71 scFv TOM A6. Das Protein wurde im Schüttelkolben produziert und im *Batch*-Verfahren mit Chelating Sepharose FF aufgereinigt. Es wurde dreimal mit Puffer mit 50 mM Imidazol gewaschen, bevor mit IMAC-Elutionspuffer in kleinem Volumen eluiert wurde. ZL vl: Zelllysate vor Induktion; ZL nE: Zelllysate nach Ernte; PPP: periplasmatische Proteinpräparation; PPP (dial.): gegen PBS dialysierte PPP vor Aufreinigung; DL: Durchlauf; W1-W3: Waschfraktionen, E: Elutionsfraktion. Das Zielprotein ist mit einem Pfeil markiert. **C) Antigen-ELISA** zum Test der Fraktionen aus der Aufreinigung. Es wurden 100 ng CD71 bzw. 1 µg BSA als Antigen verwendet. Als Negativkontrolle diente PBS. Als Positivkontrolle diente eine aus einer Fermentation stammende, aufgereinigte Probe des scFvs IQ111-2. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

Die spezifische Bindung des scFv-Klons TOM A6 an sein Ziel-Antigen CD71 wurde im ELISA nachgewiesen (Abb. 3.2-5 C). Es fiel allerdings auf, dass das ELISA-Signal der Elutionsfraktion der Aufreinigung geringer ausfiel als das der dialysierten periplasmatischen Proteinpräparation, obwohl das Zielprotein in der Elutionsfraktion viel reiner und stärker konzentriert vorlag. Offenbar verlor der scFv im Zuge seiner Aufreinigung deutlich an Aktivität, was auf eine geringe Stabilität hindeutet.

Wurde CD71 nach SDS-PAGE mittels Western Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert, so ließ sich die Proteinbande bei einer Immunfärbung mit dem scFv TOM A6 und anschließendem Nachweis über den 6xHis-Tag spezifisch anfärben (Abb. 3.2-6).

**A) SDS-Gel**

**B) Western Blots**

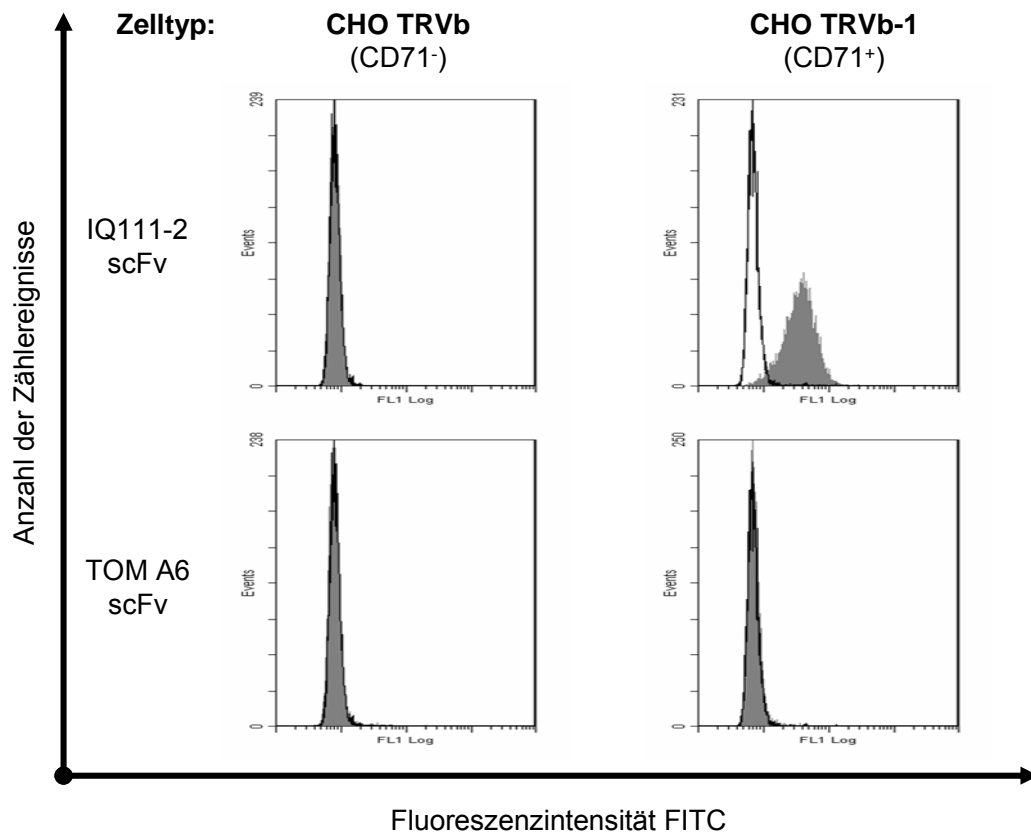


**Abb. 3.2-6: Detektion von CD71 durch TOM A6 scFv im Western Blot**

**A) SDS-Gel** nach Silberfärbung. Das CD71-Material, das auch zum *Panning* eingesetzt wurde, wurde einer SDS-PAGE unterzogen und das Gel über Silberfärbung entwickelt. Neben der mit einem Pfeil markierten CD71-Bande sind weitere Banden erkennbar, über deren Ursprung nichts bekannt ist. **B) Western Blots** mit unterschiedlichen Nachweissystemen. Von Gelen wie unter A) wurden die Proteine per Western Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert und TOM A6 scFv, ein Maus anti-CD71 IgG (Sigma) und der nicht gegen CD71 gerichtete IIB6 scFv (Toleikis, 2003) zum Nachweis eingesetzt. Die Bande bei einer Größe von 75 kDa im Western Blot mit dem TOM A6 scFv stammt vermutlich von einem über einen His-Tag nachweisbaren Protein aus dem Größenstandard, von dem eine geringe Menge versehentlich in die Spur mit der CD71-Probe geraten war. Nachweissystem für die scFvs: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. Nachweissystem für Maus anti-CD71 IgG: Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP.

Um die Bindung des scFvs an CD71 auf der Oberfläche von Zellen zu überprüfen, wurde eine Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Abb. 3.2-7). Im Gegensatz zur Probe des scFvs IQ111-2 konnte der scFv TOM A6 die CD71-positiven Zellen nicht anfärben, d. h. er zeigte keine Bindung auf

diesen Zellen. Da er somit auch nicht internalisiert werden konnte, eignete er sich nicht als Ersatz des scFvs IQ111-2 in den *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen.



**Abb. 3.2-7: Analyse des anti-CD71 scFvs TOM A6 in der Durchflusszytometrie**

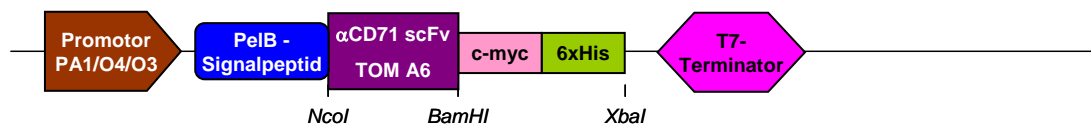
Aufgereinigter anti-CD71 scFv TOM A6 (500 ng) wurde zur Färbung von je 100.000 CD71-positiven und CD71-negativen Zellen eingesetzt (grau). Als Negativkontrolle diente der nicht gegen CD71 gerichtete scFv IIB6 (Toleikis, 2003) in gleicher Menge (schwarz umrandet). Als Positivkontrolle diente eine aus einer Fermentation stammende, aufgereinigte Probe des scFvs IQ111-2. Pro Probe wurden 10.000 Zählereignisse ausgewertet und das Ergebnis im Histogramm-Plot als Verteilungskurve der Fluoreszenzintensität dargestellt. Nachweissystem: Maus anti-His6 IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC.

### 3.2.5 LS-Konstruktvarianten auf Basis des anti-CD71 scFv TOM A6

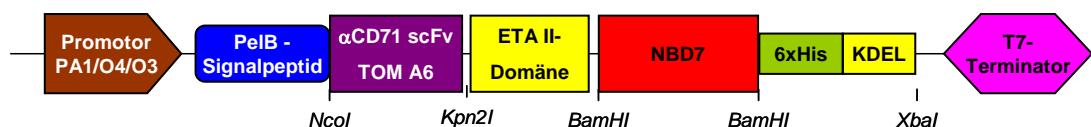
Obwohl sich im Laufe der Charakterisierung des anti-CD71 scFvs TOM A6 zeigte, dass der Antikörper sich nicht als Ersatz für den scFv IQ111-2 im Zusammenhang mit den *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen eignen würde, wurde der Klon aufgrund seiner guten Produzierbarkeit und seiner Sekretionseigenschaften für die Klonierung von LS-Konstrukten verwendet. Da im ursprünglichen Konstrukt LS7-NBDsII keine Restriktionsschnittstelle zwischen den kodierenden Sequenzen von scFv und ETA II-Domäne enthalten war, wurde eine Zweischritt-Klonierung durchgeführt, bei der eine *Kpn2I*-Restriktionsschnittstelle zwischen den DNS-Sequenzen der beiden Proteinteile eingeführt wurde, ohne die resultierende Aminosäuresequenz an dieser Stelle zu verändern. Zunächst wurde mit den Primern BVO 01 und BVO 02 auf der Grundlage des Vektors pOPE101 TOM A6 scFv ein PCR-Fragment erzeugt, welches am 5'-Ende eine *NcoI*-Schnittstelle, am 3'-Ende sowohl eine *Kpn2I*- und

dahinter auch eine *Xba*I-Schnittstelle enthält. Mit den Enzymen *Nco*I und *Xba*I wurde das Fragment geschnitten und in das Vektorgerüst des mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektors pOPE101 XP einligiert. Positive Ligationsklone wurden über Kolonie-PCR mit den Primern CM 90 und MH-pOPE-r2 identifiziert. In den neuen Vektor wurde über die Schnittstellen von *Kpn*2I und *Xba*I ein PCR-Fragment kloniert, das mit Hilfe der Primer BVO 03 und BVO 04 auf Grundlage des Vektors pOPE101 LS7-IQ111-2 generiert worden war und das für den kompletten C-terminalen Teil des LS-Konstruktes (ETA II-Domäne und NBD-Variante NBD7) kodiert. Positive Ligationsklone wurden über Kolonie-PCR mit den Primern pOPE-Seq-II-fwd und CM 8 identifiziert. Der entstandene Vektor wurde als pOPE101 LS7-TOM A6 (Abb. 3.2-8 B) bezeichnet. Die Kontrolle der Sequenz erfolgte über Sequenzierung mit Hilfe der Primer pOPE-Seq-II-fwd, pOPE-Seq-II-rev, CM 7, CM 8, CM 9, CM 10, MK-PelB-f, PelB-Leader-3'-rev, BVO 04, NBD(LS7)-fwd und BVO 13.

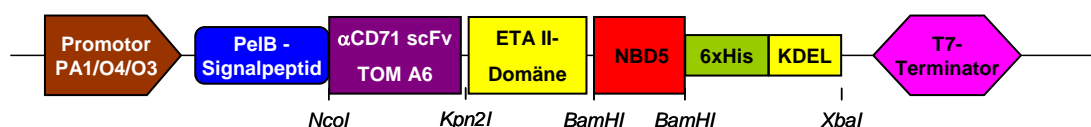
#### A) pOPE101 TOM A6 scFv



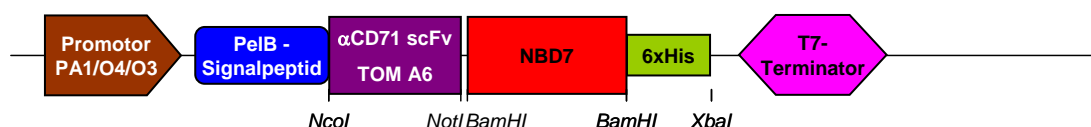
#### B) pOPE101 LS7-TOM A6



#### C) pOPE101 LS5-TOM A6



#### D) pOPE101 TOM A6-NBD7



#### E) pOPE101 TOM A6-NBD5

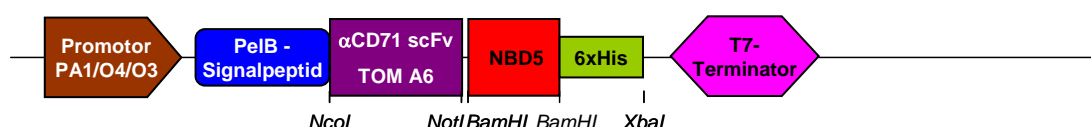


Abb. 3.2-8: Konstrukte basierend auf dem anti-CD71 scFv TOM A6 im Vektor pOPE101

Zur Klonierung der LS-Konstruktvariante mit der NBD-Variante NBD5 wurde auf Grundlage des Vektors pOPE101 LS5-IQ111-2 mit den Primern CM 9 und MH-pOPE-r2 ein PCR-Fragment erzeugt, welches mit dem Enzym *Bam*HI geschnitten und dann in das Vektorgerüst des ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Vektors pOPE101 LS7-TOM A6 kloniert wurde. Das entstandene Konstrukt wurde als pOPE101 LS5-TOM A6 bezeichnet (Abb. 3.2-8 C). Positive Ligationsklone wurden über Kolonie-PCR mit den Primern CM 9 und BVO 35 identifiziert und die korrekte Sequenz mittels Sequenzierung unter Nutzung der Primer CM 7, pOPE-Seq-II-fwd, pOPE-Seq-II-rev und PelB-Leader-3'-rev verifiziert.

Aus den Vektoren pOPE101 IQ111-2-NBD7 und pOPE101 IQ111-2-NBD5 wurde über die Schnittstellen *Nco*I und *Not*I die für den scFv kodierende Sequenz herausgeschnitten und durch das aus dem Vektor pOPE101 TOM A6 scFv ebenso herausgeschnittene Genfragment für den scFv TOM A6 ersetzt. Die entstandenen Vektoren wurden als pOPE101 TOM A6-NBD7 bzw. pOPE101 TOM A6-NBD5 (Abb. 3.2-8 D und E) bezeichnet. Positive Ligationsklone wurden über Kolonie-PCR mit den Primern BVO 13 und BVO 35 identifiziert. Die korrekte Sequenz wurde über Sequenzierung mit Hilfe der Primer BVO 35 und pOPE-Seq-II-fwd bestätigt.

### **3.2.6 Vergleich unterschiedlicher *Ligand Sneaking*-Konstrukte bezüglich der Ausbeute bei der Sekretion ins Periplasma**

Um den Einfluss der unterschiedlichen Proteinteile auf die Ausbeute des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins bei der Sekretion ins Periplasma zu überprüfen, wurden die scFvs, die LS7-, LS5-, scFv-NBD7- und scFv-NBD5-Fusionsproteine, basierend sowohl auf dem scFv IQ111-2 als auch dem scFv TOM A6, parallel produziert. Die Menge an Schocklösung bei der Präparation der periplasmatischen Proteinfraction wurde dabei proportional zur Zelldichte (OD600) der jeweiligen Kultur gewählt. Da somit die Zellkonzentration in der Schocklösung für die unterschiedlichen Konstrukte gleich war, hing die mittels Western Blot und anschließender Immunfärbung nachweisbare Menge an Zielprotein nur noch von der Fähigkeit des Moleküls, sekretiert zu werden, und von seiner Stabilität ab (Abb. 3.2-9). Es bestätigte sich, dass der TOM A6 scFv deutlich besser sekretiert wurde als der IQ111-2 scFv. Auch das auf dem TOM A6 scFv basierende LS5-Protein und das scFv-NBD5-Protein wurden deutlich stärker sekretiert als die entsprechenden IQ111-2-Fusionen. Die Bande des TOM A6-NBD5-Proteins war schwächer als die der Proteine LS5-TOM A6 und TOM A6 scFv (siehe dazu Kapitel 3.2.9). Wurde die NBD-Variante NBD7 in Verbindung mit dem TOM A6 scFv verwendet, wurde die Sekretionsfähigkeit des jeweiligen Proteins (LS7-TOM A6, TOM A6-NBD7) drastisch herabgesetzt.

Unter der Annahme, dass es sich bei der oberen der beiden Banden im Western Blot um das noch unprozessierte Zielprotein mit PelB-Signalpeptid handelt, lassen sich in der Probe des Fusionsproteins IQ111-2-NBD7 neben der prozessierten Form des Zielproteins auch deutliche Mengen an unprozessiertem Protein mit noch vorhandenem N-terminalen PelB-Signalpeptid detektieren. Da das Zellpellet dieser Kultur im Gegensatz zu allen anderen Kulturen zäh und viskos war, kann davon

ausgegangen werden, dass es zu einer starken Zelllyse während der Produktion gekommen ist. Das detektierte Material wird daher teils zytoplasmatischen Ursprungs gewesen sein und nicht ausschließlich aus der periplasmatischen Proteinfraction stammen.

| Konstrukt-bezeichnung | Aufbau des Fusionsproteins |               |              | scFv    | scFv   |
|-----------------------|----------------------------|---------------|--------------|---------|--------|
|                       | scFv                       | ETA II-Domäne | NBD-Variante | IQ111-2 | TOM A6 |
| scFv                  | sc Fv                      | ---           | ---          |         |        |
| LS7                   | sc Fv                      | ETA II        | NBD7         |         |        |
| LS5                   | sc Fv                      | ETA II        | NBD5         |         |        |
| scFv-NBD7             | sc Fv                      | ---           | NBD7         |         |        |
| scFv-NBD5             | sc Fv                      | ---           | NBD5         |         |        |

**Abb. 3.2-9: Vergleich der Sekretionsfähigkeit von LS-Fusionsproteinen basierend auf den anti-CD71 scFvs IQ111-2 und TOM A6**

Die zehn Varianten der *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine, basierend auf den scFvs IQ111-2 und TOM A6, wurden parallel in Schüttelkolben produziert und die periplasmatische Proteinfraction isoliert, wobei für alle Kulturen das gleiche Verhältnis von Zelldichte zu Puffervolumen eingestellt wurde. Proben der periplasmatischen Proteinpräparation wurden im Western Blot mit anschließender Immunfärbung analysiert und die Banden der detektierten Zielproteine tabellarisch der jeweiligen schematisierten Domänenzusammensetzung des zugehörigen Fusionsproteins zugeordnet. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP.

Dieser Vergleich der unterschiedlichen LS-Konstruktvarianten basierend auf zwei unterschiedlichen anti-CD71 scFvs zeigt also, dass eine Produktion eines Konstruktes aus scFv, ETA II-Domäne und NBD-Effektordomäne auf sekretorischem Wege möglich ist, wenn statt der Variante NBD7 die Variante NBD5 eingesetzt wird und der gewählte scFv selbst ebenfalls gut sekretiert wird. Um einen geeigneten scFv-Klon für ein solches LS5-Konstrukt zu gewinnen, wurden von Saskia Helmsing und Dr. Michael Hust aus der naiven scFv-Antikörperfragment-Genbibliothek HAL4 über Phagendisplay durch *Panning* auf immobilisiertem, humanem CD71 Gene für anti-CD71 scFvs isoliert. Über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* wurden die für die scFvs kodierenden DNS-Sequenzen aus dem Phagemid pHAL14 in den Expressionsvektor pOPE101 XP umklont. Über Sequenzierung mit den Primern MK-PeIB-f und MK-myc-r wurde die korrekte Sequenz bestätigt. Diese anti-CD71 scFv-Klone werden im Folgenden näher charakterisiert.



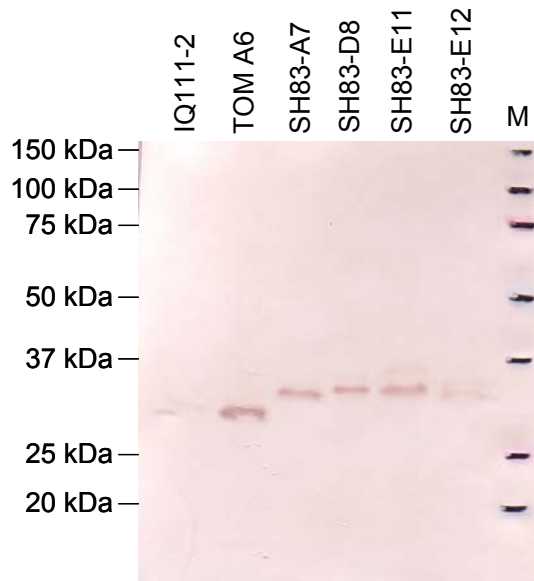
### 3.2.7 Charakterisierung der anti-CD71 scFvs aus der Bibliothek HAL4

Die unterschiedlichen scFv-Klone wurden auf sekretorischem Wege produziert und dabei ihre Sekretionseigenschaften mit denen der anti-CD71 scFvs IQ111-2 und TOM A6 verglichen. Die scFvs wurden mit Chelating Sepahrose FF über ihren 6xHis-Tag aufgereinigt und im Antigen-ELISA (Abb. 3.2-10) sowie in der Durchflusszytometrie (Abb. 3.2-11) getestet.

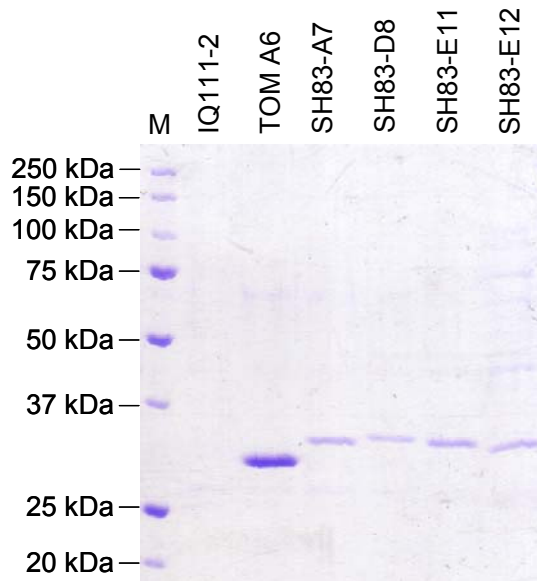
Der Vergleich der Sekretionseigenschaften im Western Blot (Abb. 3.2-10 A) zeigte, dass sich von den isolierten scFvs die Klone SH83-A7, SH83-D8 und SH83-E11 gut sekretieren ließen, wenn auch nicht so gut wie der anti-CD71 scFv TOM A6. Der Klon SH83-E12 hingegen ließ sich deutlich schlechter sekretieren. Nach der Aufreinigung (Abb. 3.2-10 B) wurde die Proteinmenge über einen Bradford-Assay bestimmt und gleiche Mengen an Zielprotein für einen Antigen-ELISA (Abb. 3.2-10 C) eingesetzt. Im Antigen-ELISA waren die Signale für alle Klone sehr gering. Um zu überprüfen, ob die scFvs während der Aufreinigung ihre Aktivität verloren hatten, wurden sie zusätzlich mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 3.2-11). Hier erwies sich, dass die scFvs auf Zellen deutliche Aktivität zeigten und ihre Bindung an CD71-positive Zellen spezifisch war. Der Klon SH83-D8 zeigte dabei die schwächste Bindung beim Einsatz von 600 ng scFv; bei Verminderung der eingesetzten scFv-Menge auf 100 ng reduzierte sich die Intensität der Zellfärbung deutlich. Dies sprach für eine geringe Affinität dieses Klons. Die drei anderen Klone zeigten dagegen in beiden Verdünnungsstufen vergleichbare Signale.

Hinsichtlich der Verwertung in einem *Ligand Sneaking*-Konstrukt wurden der Klon SH83-D8 aufgrund seines Ergebnisses in der Durchflusszytometrie und der Klon SH83-E12 aufgrund seiner geringen Ausbeute bei Sekretion ins Periplasma nicht weiter berücksichtigt. Der anti-CD71 scFv SH83-A7 wurde hinsichtlich seiner Internalisierung durch CD71-positive Zellen untersucht (Abb. 3.2-12). Auf CD71-negativen CHO TRVb-Zellen zeigte er keine Bindung, die Fluoreszenzsignale waren nicht stärker als die der Negativkontrolle. Auf CD71-positiven CHO TRVb-1- und HeLa-Zellen verursachte er bei 4 °C eine Anfärbung der Zellmembran: Dies war entweder durch eine intensivere Färbung des Zellrandes zu erkennen oder aber durch einen nur diffus gefärbten perinukleären Bereich. Nur dort lag die Zellmembran außerhalb des Fokus der mikroskopischen Aufnahme, während beim restlichen, sehr flach an die Unterlage anhaftenden Zellkörper nicht zwischen einer Färbung auf der Ober- oder Unterseite des Zellkörpers und einer Färbung innerhalb des Zellkörpers unterschieden werden konnte. Bei 37 °C verteilten sich die Fluoreszenzsignale über die gesamte Zelle.

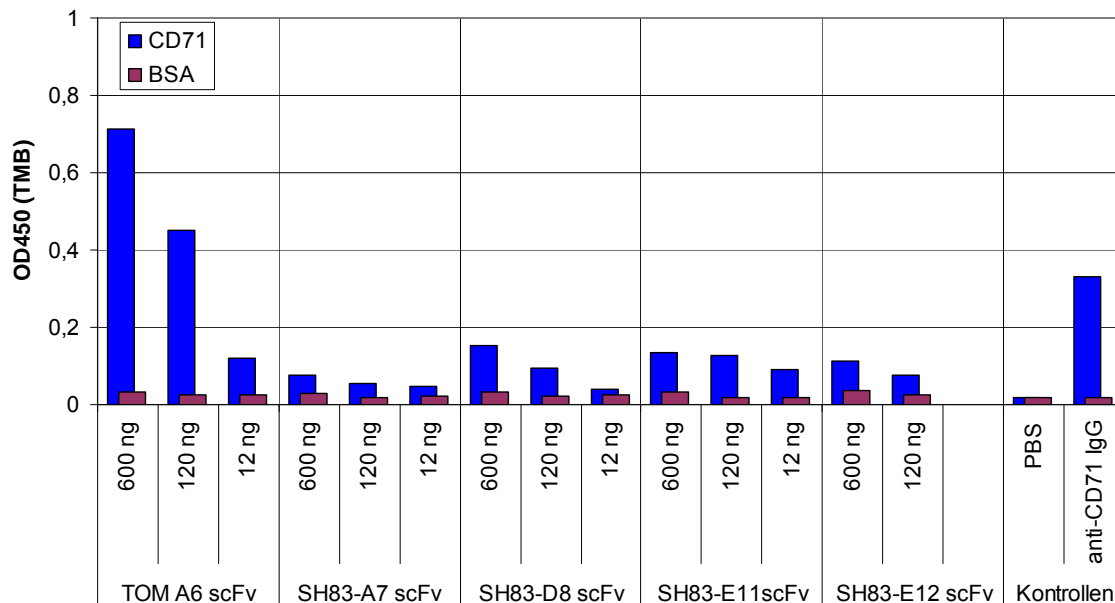
**A) Vergleich der Sekretion**



**B) SDS-Gel nach Aufreinigung**

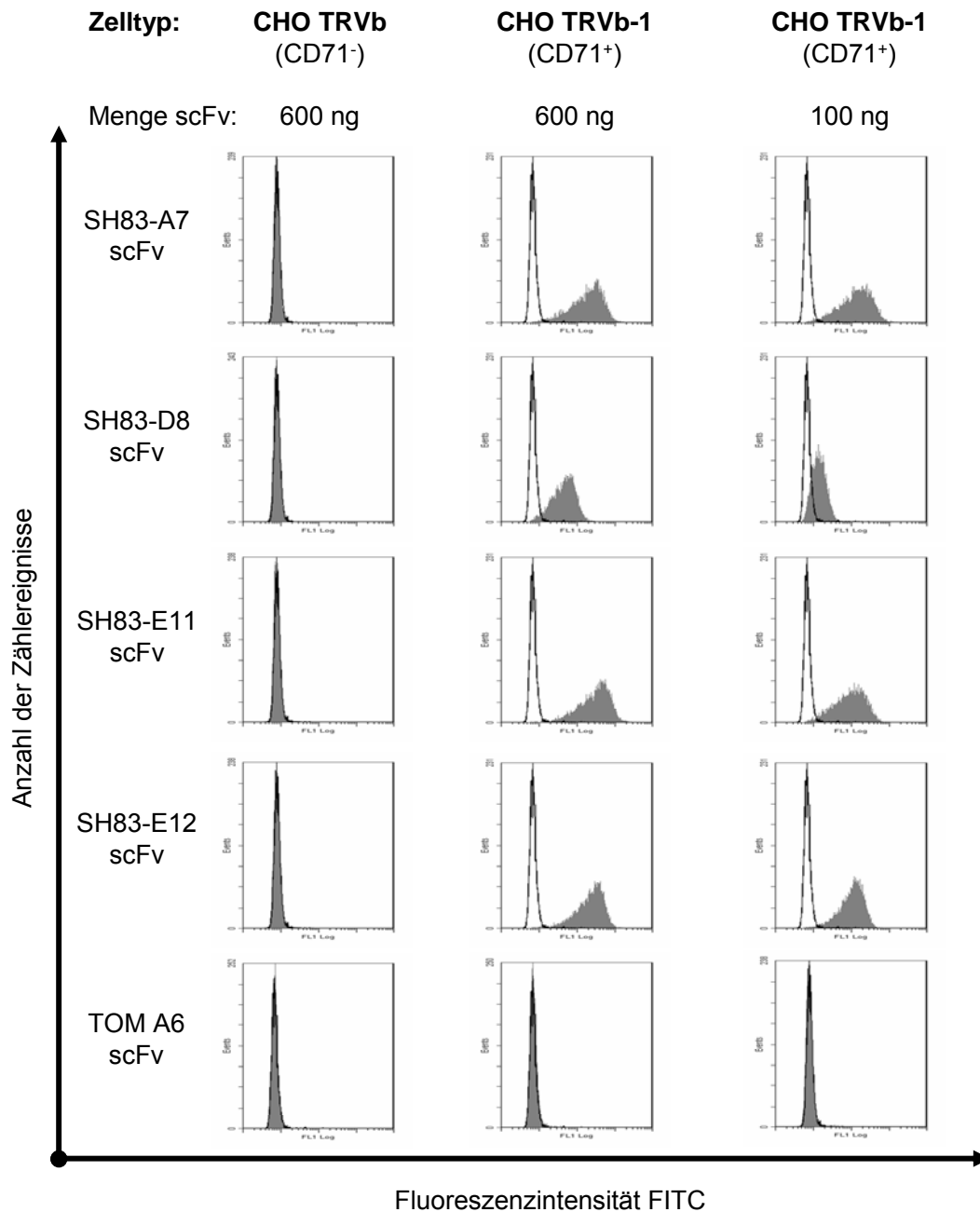


**C) Antigen ELISA mit Elutionsfraktionen nach Aufreinigung**



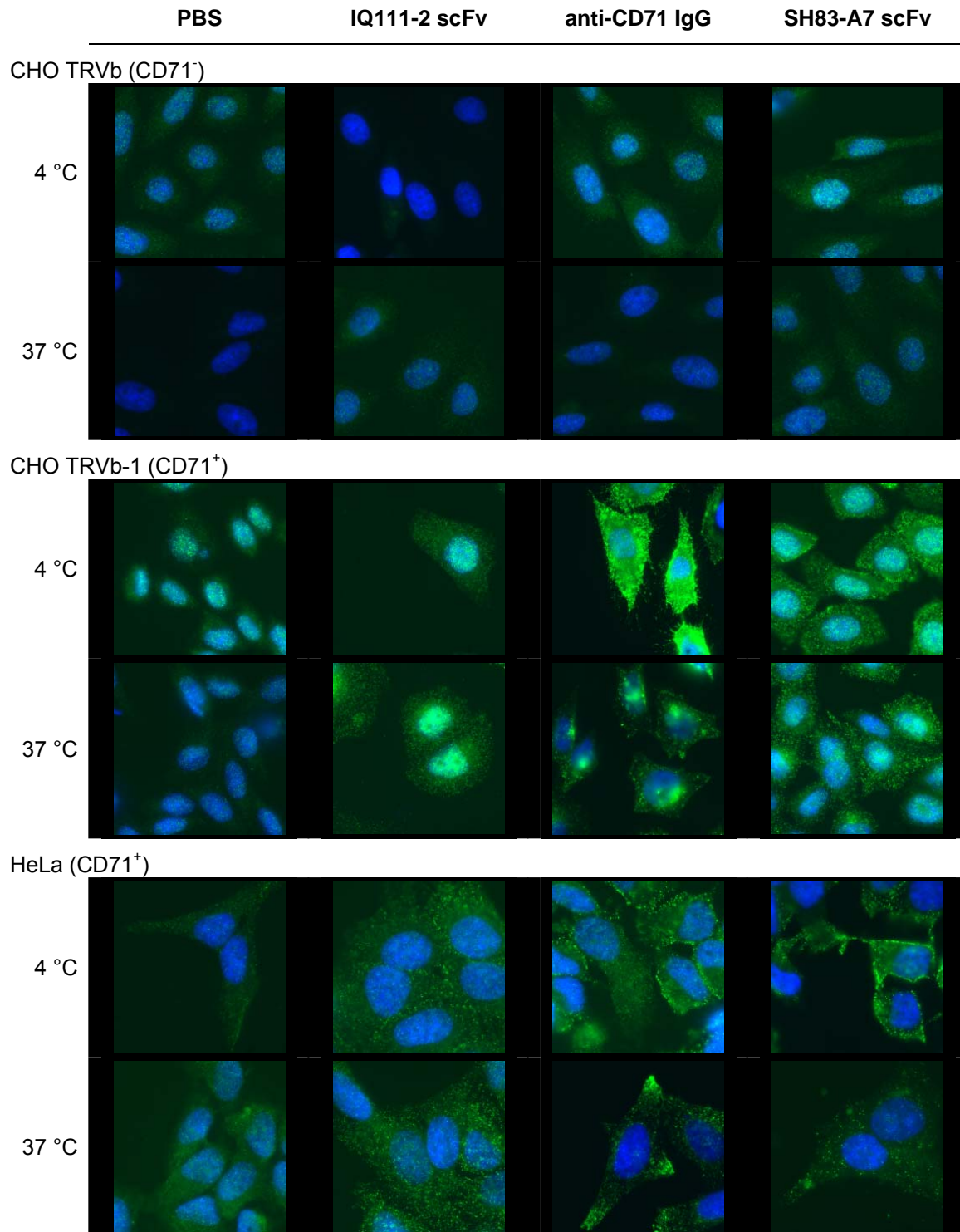
**Abb. 3.2-10: Charakterisierung der anti-CD71 scFvs aus der scFv-Antikörperfragment-Genbibliothek HAL4**

**A) Western Blot** mit Proben der auf die Zelldichte normierten periplasmatischen Proteinpräparationen. Die scFvs IQ111-2 und TOM A6 dienen als Kontrollen. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. **B) SDS-Gel** nach Coomassie-Färbung mit Proben der Elutionsfraktionen nach der Aufreinigung der produzierten scFvs über den 6xHis-Tag. **C) Antigen-ELISA** mit den Elutionsfraktionen nach der *Batch*-Aufreinigung der scFvs über den 6xHis-Tag. Die Quantifizierung der Antikörperfragmente war über einen Bradford-Assay erfolgt. Als Negativkontrolle diente PBS. Als Positivkontrolle diente ein kommerzieller Maus anti-CD71 IgG. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.



**Abb. 3.2-11: Durchflusszytometrische Analyse der anti-CD71 scFvs aus der scFv-Antikörper-fragment-Genbibliothek HAL4**

Über einen Bradford-Assay wurde die scFv-Menge in den Elutionsfraktionen nach der Aufreinigung über den 6xHis-Tag bestimmt und jeweils gleiche Mengen für durchflusszytometrische Messungen eingesetzt. Pro Probe wurden 10.000 Zählereignisse ausgewertet und das Ergebnis im Histogramm-Plot als Verteilungskurve der Fluoreszenzintensität dargestellt. Als Positivkontrolle (nicht gezeigt) diente eine aus einer Fermentation stammende, aufgereinigte Probe des scFvs IQ111-2. Die Verteilungskurven der scFvs sind grau dargestellt. Als Negativkontrolle diente der nicht gegen CD71 gerichtete scFv IIB6 (Tolakis, 2003) in gleicher Menge (schwarz umrandet). Nachweissystem: Maus anti-His6 IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC.



**Abb. 3.2-12: Internalisierung des anti-CD71 scFvs SH83-A7**

Sowohl mit CD71-positiven als auch mit CD71-negativen Zellen wurde ein Internalisierungsassay durchgeführt. Die Inkubation mit den oben aufgeführten Antikörpern (PBS diente als Negativkontrolle) wurde bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt: Bei 37 °C sollte es zu einer Internalisierung kommen, bei 4 °C sollte es nicht dazu kommen und stattdessen nur die Zelloberfläche angefärbt werden. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Nachweissystem für scFvs und Negativkontrolle: Maus anti-His6 IgG + Ziege anti-Maus IgG (H&L-Kette)-AlexaFluor488. Nachweissystem anti-CD71-IgG: Ziege anti-Maus IgG (H&L-Kette)-AlexaFluor488. Nachweis der Zellkerne: DAPI-Färbung.

### 3.2.8 Klonierung von LS-Konstruktvarianten mit dem anti-CD71 scFv SH83-A7 und dem anti-MUC1 scFv HT186-D11

Da der anti-CD71 scFv SH83-A7 hinsichtlich der Produzierbarkeit, seiner Spezifität und seines Verhaltens im Internalisierungsassay die Anforderungen für die Verwendung in einem *Ligand Sneaking*-Konstrukt zu erfüllen schien, wurde er trotz des fehlenden Signals im ELISA als scFv in *Ligand Sneaking*-Konstrukte eingesetzt. Zusätzlich wurden Kontrollkonstrukte mit einem nicht-CD71-bindenden scFv, dem aus einem Affinitätsreifungsprojekt hervorgegangenen anti-MUC1 scFv HT186-D11 (Holger Thie, AG Dübel, TU Braunschweig), kloniert.

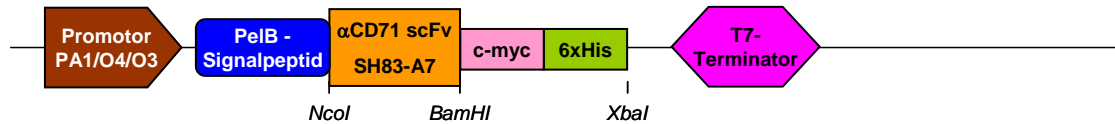
Zur Generierung von auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 basierenden *Ligand Sneaking*-Konstrukten wurde mit Hilfe der Primer BVO 60 und BVO 61 von der Vorlage pOPE101 SH83-A7 scFv (Abb. 3.2-13 A) ein PCR-Fragment erzeugt. Dieses hatte eine *Nco*I-Restriktionsstelle am 5'-Ende sowie eine *Kpn*2I- und nachfolgend eine *Xba*I-Schnittstelle am 3'-Ende. Über die Schnittstellen *Nco*I und *Xba*I wurde das PCR-Fragment in den Vektor pOPE101 XP einkloniert. Mit den Primern BVO 03 und BVO 04 wurden weitere PCR-Fragmente von den Vorlagen pOPE101 LS7-IQ111-2 und pOPE101 LS5-IQ111-2 generiert und diese über die Schnittstellen *Kpn*2I und *Xba*I in den neu entstandenen Vektor hinter der für den scFv kodierenden Sequenz einkloniert. Die beiden Konstrukte wurden pOPE101 LS7-SH83-A7 (Abb. 3.2-13 B) bzw. als pOPE101 LS5-SH83-A7 (Abb. 3.2-13 C) benannt. Durch Restriktion mit dem Enzym *Bam*HI wurde aus dem Konstrukt pOPE101 LS5-SH83-A7 die für die NBD-Variante NBD5 kodierende DNS-Sequenz ausgeschnitten und das Vektorgerüst religiert, wodurch ein NBD-freies Kontrollkonstrukt entstand, das als pOPE101 LSdeltaNBD-SH83-A7 bezeichnet wurde (Abb. 3.2-13 D). Zusätzlich wurde aus den Konstrukten pOPE101 IQ111-2-NBD5 und pOPE101 IQ111-2-NBD7 über Restriktion mit den Enzymen *Nco*I und *Not*I der für den scFv IQ111-2 kodierende Teil ausgeschnitten und durch den für den SH83-A7 scFv kodierenden Teil aus dem mit den gleichen Enzymen geschnittenen Konstrukt pOPE101 SH83-A7 scFv ersetzt. Die so entstandenen Konstrukte wurden als pOPE101 SH83-A7-NBD7 (Abb. 3.2-13 F) bzw. pOPE101 SH83-NBD5 (Abb. 3.2-13 G) bezeichnet.

Positive Ligationsklone wurden jeweils über Kolonie-PCR identifiziert und die Sequenz von Einzelklonen durch Sequenzierung mit den Primern MK-PelB-f, MH-pOPE-r2, BVO 03, BVO 04, BVO 29, BVO 30, BVO 31, BVO 60, BVO 61, CM 7, CM 8 und PelB-Leader-3'-rev überprüft.

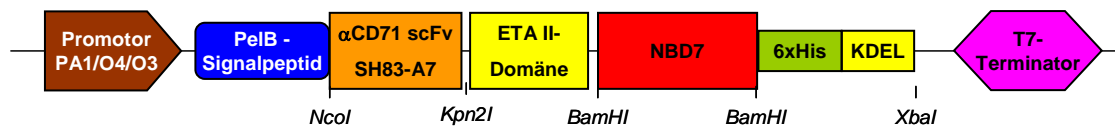
Um Kontrollkonstrukte mit einem nicht-CD71-bindenden scFv zu generieren, wurde in den entstandenen Konstrukten der für den anti-CD71 scFv SH83-A7 kodierende Teil ausgeschnitten und durch einen für den anti-MUC1 scFv HT186-D11 kodierenden Teil ersetzt. Für die entsprechenden LS5-, LS7- und LSdeltaNBD-Konstrukte wurde mit Hilfe der Primer BVO 74 und BVO 75 ein PCR-Fragment auf der Grundlage des Vektors pCMV HT186-D11 scFv-Fc erzeugt, dessen Klonierung über die Restriktionsstellen *Nco*I und *Kpn*2I durchgeführt wurde. Die Klonierungen der Konstrukte pOPE101 HT186-D11-NBD5 und pOPE101 HT186-D11-NBD7 wurden analog der Klonierung der entsprechenden Konstrukte mit dem SH83-A7 scFv durchgeführt. Die Konstrukte wurden produziert

und für vergleichende Studien in der Durchflusszytometrie und in NF-kappaB-Reporterzellassays eingesetzt.

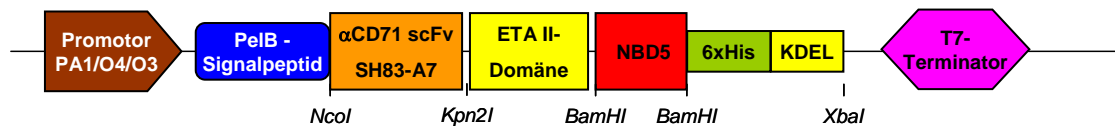
**A) pOPE101 SH83-A7 scFv**



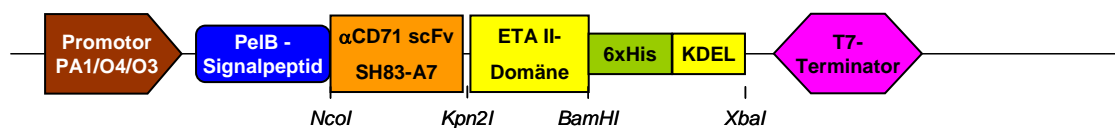
**B) pOPE101 LS7-SH83-A7**



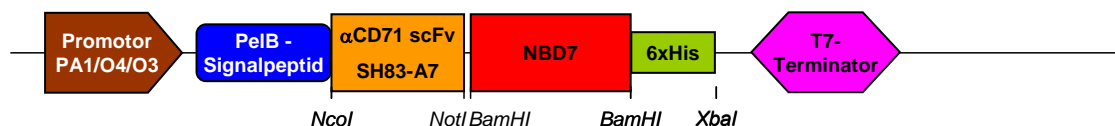
**C) pOPE101 LS5-SH83-A7**



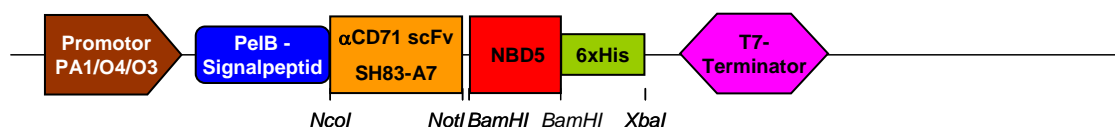
**D) pOPE101 LSdeltaNBD-SH83-A7**



**E) pOPE101 SH83-A7-NBD7**



**F) pOPE101 SH83-A7-NBD5**



**Abb. 3.2-13: Konstruktvarianten basierend auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 im Vektor pOPE101**

Analoge Konstrukte wurden auch für den anti-MUC1 scFv HT186-D11 kloniert.











### 3.2.9 Produktion der LS-Fusionsproteine auf Basis des anti-CD71 scFv SH83-A7 und des anti-MUC1 scFv HT186-D11

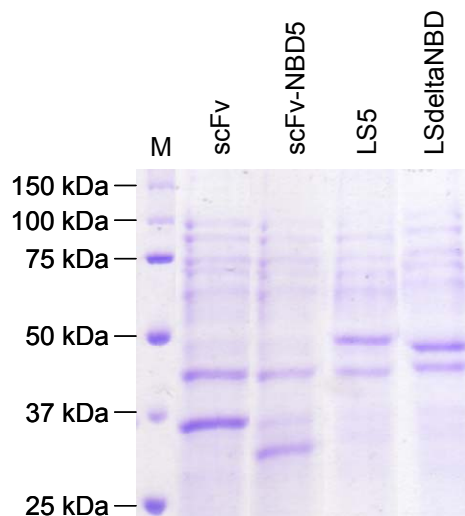
In zwei getrennten Experimenten wurden sowohl die jeweils sechs Varianten der auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 als auch der auf dem anti-MUC1 scFv HT186-D11 basierenden LS-Fusionsproteine parallel produziert und hinsichtlich ihrer Ausbeute bei der Sekretion ins Periplasma verglichen (Abb. 3.2-14 A). Es ergab sich ein zum Verhalten der Konstrukte mit dem anti-CD71 scFv TOM A6 vergleichbares Bild: Der scFv und das LS5- wie auch das LSdeltaNBD-Fusionsprotein wurden gut sekretiert, während die Fusionsproteine mit der NBD-Variante NBD7 schlecht sekretiert wurden. Wie auch schon bei den scFv-NBD5-Fusionen mit den scFvs IQ111-2 und TOM A6 festgestellt wurde, ist auch bei den Konstrukten mit den scFvs SH83-A7 und HT186-D11 die Bande im Western Blot für dieses Protein extrem schwach.

Bei der Analyse derselben Proben per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.2-14 B) wurde in den periplasmatischen Proteinfractionen aller Konstrukte stets eine deutliche Bande bei ca. 45 kDa detektiert. Für den scFv, das LS5- und das LSdeltaNBD-Fusionsprotein konnte eine Bande bei der erwarteten molekularen Masse nachgewiesen werden. Die scFv-NBD5-Fusion hingegen, dessen Bande ungefähr auf der Höhe des scFv-Antikörperfragmentes laufen sollte, zeigte nur eine Bande geringer Intensität bei dieser Größe. Dafür war eine Bande bei einer etwas geringeren Größe deutlich sichtbar, die in keiner Probe einer anderen Konstruktvariante auftrat. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Protein um degradiertes scFv-NBD5-Fusionsprotein handelte, das sich aufgrund des Verlustes des C-terminalen 6xHis-Tags nicht mehr mittels Immunfärbung nach Western Blot detektieren ließ, weswegen die Bande beim Vergleich der Sekretionseigenschaften so schwach ausfiel.

Während das Fusionsprotein LS5-HT186-D11 aus technischen Gründen im Schüttelkolben produziert wurde, wurden die Proteine SH83-A7 scFv, LS5-SH83-A7 und LSdeltaNBD-SH83-A7 im Bioreaktor produziert. Exemplarisch werden hier Daten für die Produktion des Proteins LSdeltaNBD-SH83-A7 gezeigt (Abb. 3.2-15 A). Die Temperatur wurde für die gesamte Wachstumsphase der Zellen auf 30 °C geregelt. Nach Zugabe der Vorkultur zum Zeitpunkt 0 h begannen die Zellen zu wachsen, was sich zunächst nur durch eine Abnahme des Gelöstsauerstoff-Wertes ( $pO_2$ ) zeigte. Dieser wurde durch Variation der Rührerdrehzahl im Bereich von 200 – 800 rpm auf 30% reguliert. Nach 3,5 h erreichte das Zellwachstum eine Rate, bei dem auch die Abluftsensorik sensitiv genug war, um eine messbare Abnahme an Sauerstoff und eine entsprechende Zunahme an Kohlendioxid in der Abluft des Bioreaktors zu messen. Daraus wurden die Sauerstoffaufnahme (*oxygen uptake rate*, OUR) und Kohlendioxidabgaberate (*carbon dioxide evolution rate*, CER) berechnet. OUR und CER sind zu jedem Zeitpunkt des Prozesses ungefähr gleich, was dafür spricht, dass es nie zu einem Gärprozess während der Fermentation gekommen ist. CER und OUR sanken parallel ab, während der  $pO_2$ -Wert stieg, als die Temperatur zur Induktion auf 25 °C gesenkt wurde.

**A) Tabellarischer Vergleich der Sekretionseigenschaften von LS-Fusionsproteinen**

| Konstrukt-<br>bezeichnung | Konstrukttaufbau |               |              | scFv<br>SH83-A7  | scFv<br>HT186-D11   |
|---------------------------|------------------|---------------|--------------|--|---|
|                           | scFv             | ETA II-Domäne | NBD-Variante |  |   |
| scFv                      | sc Fv            | ---           | ---          |  |  |
| LS7                       | sc Fv            | ETA II        | NBD7         |  |  |
| LS5                       | sc Fv            | ETA II        | NBD5         |  |  |
| LSdeltaNBD                | sc Fv            | ETA II        | ---          |  |  |
| scFv-NBD7                 | sc Fv            | ---           | NBD7         |  |  |
| scFv-NBD5                 | sc Fv            | ---           | NBD5         |  |  |

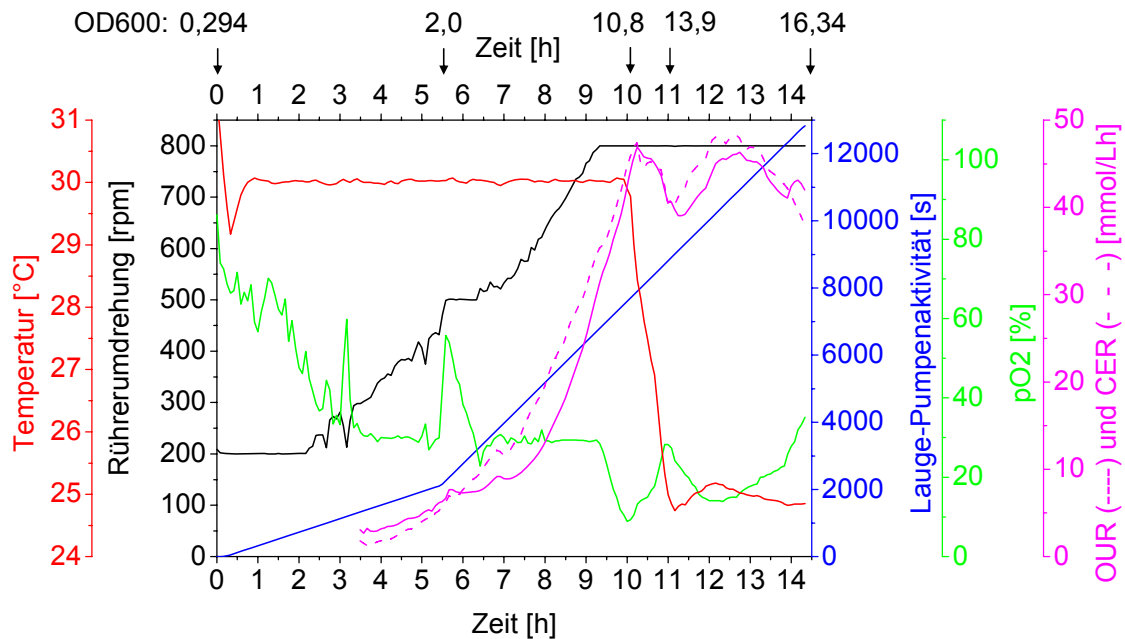
**B) SDS-Gel mit Proben von periplasmatischen Präparationen**

**Abb. 3.2-14: Vergleich der Ausbeute von LS-Fusionsproteinen basierend auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 und dem anti-MUC1 scFv HT186-D11 bei Sekretion ins Periplasma**

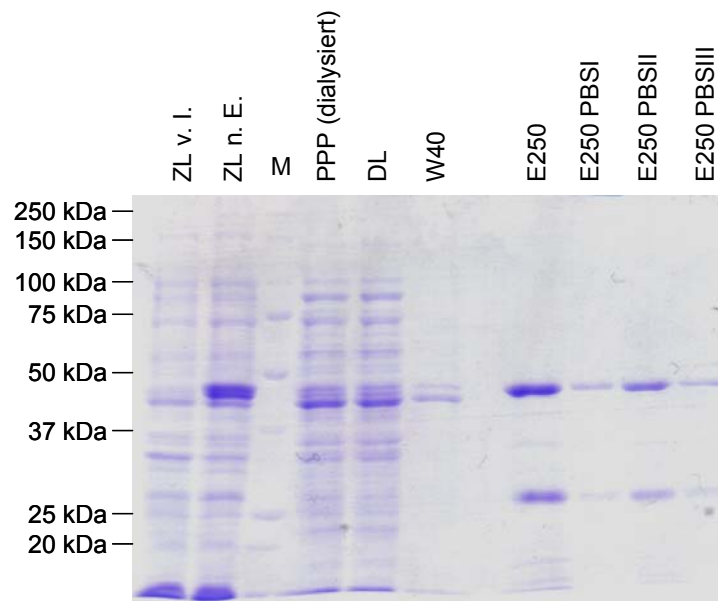
**A) Tabellarischer Vergleich.** Unabhängig voneinander wurden die klonierten *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine basierend auf dem scFv SH83-A7 und dem scFv HT186-D11 parallel in Schüttelkolben produziert und die periplasmatische Proteinfraction isoliert. Dabei wurde im jeweiligen Experiment das gleiche Verhältnis von Zelldichte (OD600) zu Puffervolumen eingestellt. Proben der periplasmatischen Proteinpräparation wurden im Western Blot analysiert und die Banden der detektierten Zielproteine tabellarisch der jeweiligen schematisierten Domänenzusammensetzung des zugehörigen Konstruktes zugeordnet. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. **B) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung** mit Proben der periplasmatischen Proteinpräparationen von LS-Fusionsproteinen basierend auf dem anti-MUC1 scFv HT186-D11.



### A) Fermentationslauf zur Produktion des Fusionsproteins LSdeltaNBD-SH83-A7



### B) SDS-Gel zur Analyse von Proben des Fusionsproteins LSdeltaNBD-SH83-A7

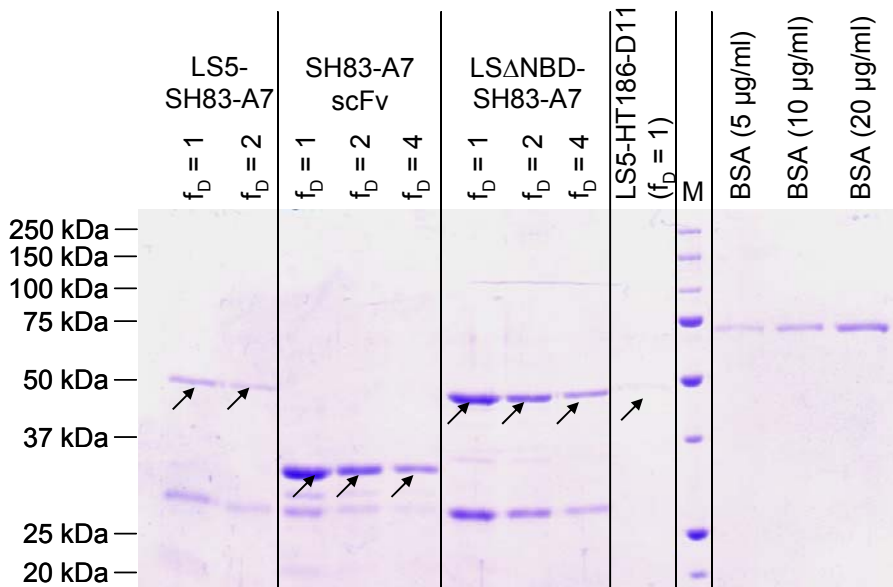


**Abb. 3.2-15: Produktion des Fusionsproteins LSdeltaNBD-SH83-A7 im Bioreaktor**

**A) Daten der Sensorik** bei der Fermentation. Aufgenommen wurden die Temperatur des Reaktorinhaltes, die Rührerdrehzahl, die kumulative Laufzeit der Laugepumpe, die Konzentration des gelösten Sauerstoffs ( $pO_2$ ) sowie die aus den Daten der Abluftsensorik errechnete Sauerstoffaufnahme (OUR) und  $CO_2$ -Abgaberate (CER). Da die pH-Elektrode bei diesem Lauf ausgefallen war, wurde kontinuierlich Lauge zugepumpt. **B) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung** mit Proben aus der Fermentation. ZL v. I.: Zelllysat vor Induktion. ZL n. E.: Zelllysat nach Ernte. M: Größenstandard. PPP (dialysiert): gegen PBS umgepufferte periplasmatische Proteinpräparation. DL: Durchlauf der Aufreinigung über 6xHis-Tag. W40: Waschfraktion mit 40 mM Imidazol. E250: Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol. E250 PBSI/PBSII/PBSIII: Vor-, Mittel- und Nachlaufraktion der Umpufferung der Elutionsfraktion gegen PBS über eine HiTrap Desalting 5 ml-Säule (GE Healthcare) an der FPLC-Anlage ÄKTAPurifier.

Die Mikroorganismen mussten sich zu diesem Zeitpunkt metabolisch auf die geringere Temperatur einstellen, was ihre Wachstumsrate senkte. Außerdem stieg durch die geringere Temperatur die Löslichkeit von Sauerstoff im Fermentationsmedium. OUR und CER stiegen dann zunächst wieder, bis sie nach ca. 13 h abzufallen begannen – der  $pO_2$ -Wert zeigte einen dazu gegenläufigen Verlauf. Dies spricht für eine kurze Wachstumsphase nach der Induktion, zum Ende aber stellte die Kultur das Wachstum ein und begann, in eine Absterbephase überzugehen.

Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Nach der Dialyse gegen PBS wurde aus dieser im *Batch*-Verfahren das Zielprotein aufgereinigt und die Elutionsfraction erneut gegen PBS umgepuffert (Abb. 3.2-15 B). Dieses Verfahren wurde analog für die anderen *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine angewandt (Abb. 3.2-16). Die Präparationen der aufgereinigten Zielproteine wurden mit 20% FCS als Schutzprotein versetzt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



**Abb. 3.2-16: Aufgereinigte Fusionsproteine auf Basis der scFvs SH83-A7 und HT186-D11**

SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben der aufgereinigten, gegen PBS umgepufferten LS-Fusionsproteine. Neben den Zielproteinen (mit Pfeilen markiert) wurden Kontaminanten detektiert. Die Proteine auf Basis des anti-CD71 scFvs SH83-A7 wurden im Bioreaktor, das Konstrukt LS5-HT186-D11 im Schüttelkolben produziert. Anhand der BSA-Standardreihe können die Konzentrationen der Zielproteine abgeschätzt werden: LS5-SH83-A7 ca.  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , SH83-A7 scFv und LS $\Delta$ NBD-SH83-A7 jeweils ca.  $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ , LS5-HT186-D11 max.  $2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

### 3.2.10 Evaluierung der LS-Konstrukte basierend auf den scFvs SH83-A7 und HT186-D11 in Durchflusszytometrie und NF-kappaB-Zellassay

Proben der mit 20% FCS als Schutzprotein bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen LS-Konstrukte wurden aufgetaut und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.2-17). Die Konstrukte mit dem anti-CD71 scFv SH83-A7 banden spezifisch an CD71-positive CHO TRVb-1-Zellen, aber nicht an CD71-negative CHO TRVb-Zellen. Die Probe des Proteins LS5-SH83-A7 zeigte die schwächste Bindung, das Protein war in

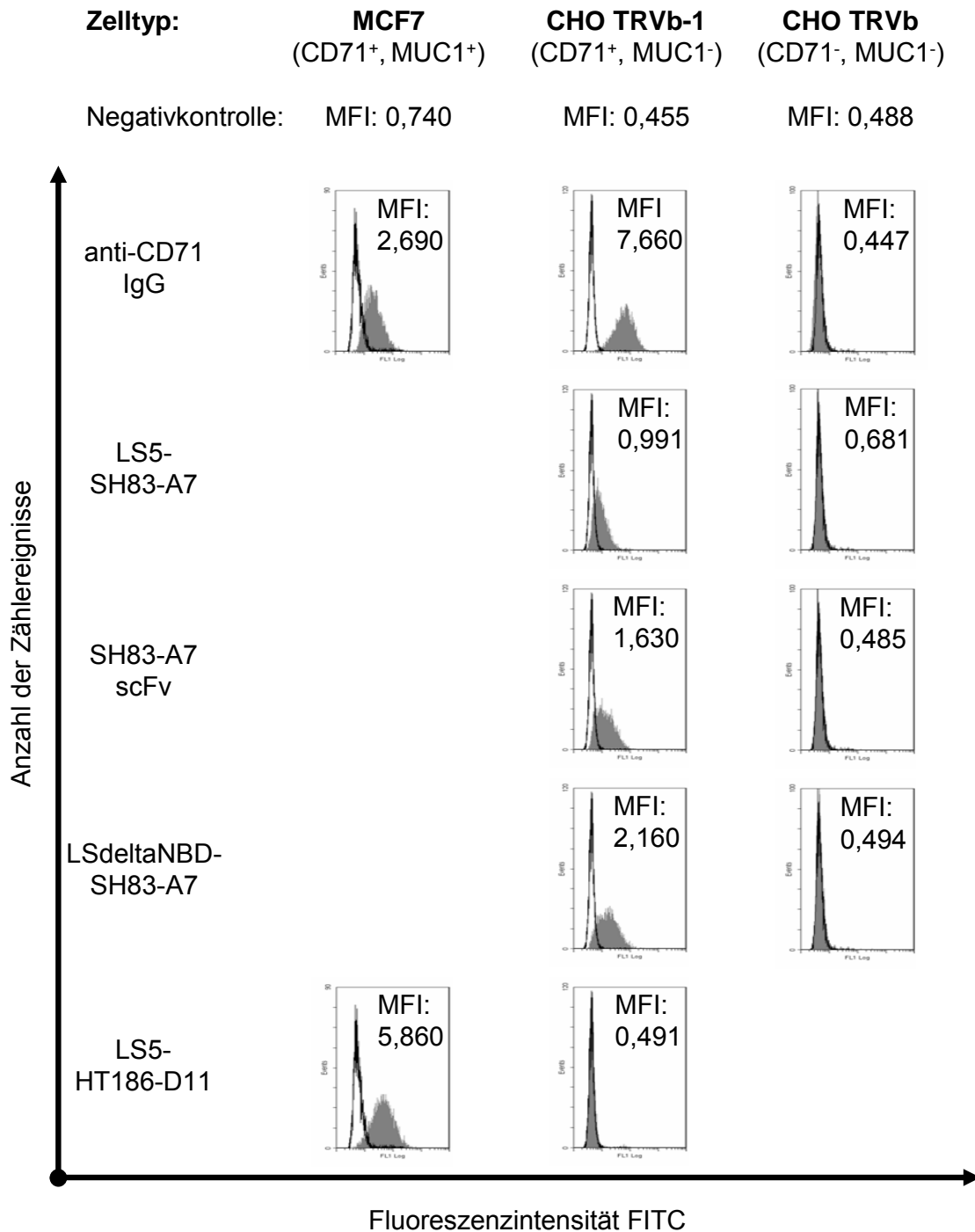
dieser Probe auch am geringsten konzentriert (vgl. Abb. 3.2-16). Die Zelfärbung durch die Proteine LSdeltaNBD-SH83-A7 und SH83-A7 scFv war vergleichbar. Auch das Kontrollprotein LS5-HT186-D11 band spezifisch an die MUC1-positiven MCF7-Zellen, nicht aber an die MUC1-negativen CHO TRVb-1-Zellen. Trotz der sehr geringen Konzentration des Proteins in der Probe wurden die MUC1-positiven Zellen sehr intensiv angefärbt, was für eine hohe Affinität des scFv-Antikörperfragments spricht.

In einem NF-kappaB-Reporterzellassay wurde getestet, ob die Präparationen der *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine die Aktivierung des NF-kappaB-Signaltransduktionsweges durch Interleukin 1-beta (IL1-beta) unterbinden konnten. Die verwendeten Zellen enthielten ein Gen für Luciferase unter Kontrolle eines durch NF-kappaB induzierbaren Promotors. Es wurde nach der Aktivierung des Transkriptionsfaktors die Luciferase-Aktivität mit einem Lumineszenz-Detektor gemessen (Abb. 3.2-18).

Beim NF-kappaB-Reporterzellassay wurde zunächst kontrolliert, ob das Schutzprotein (20% FCS) einen Einfluss auf die Aktivierung des NF-kappaB-Signaltransduktionsweges hatte. Dies war nicht der Fall, denn die in der Kontrollprobe PBS + 20% FCS gemessene Luciferaseaktivität unterschied sich nicht signifikant von der Aktivität in der Probe, in der nur PBS verwendet wurde. In den Ansätzen, in denen die Zellen mit PBS inkubiert, dann aber nicht mit Interleukin 1-beta aktiviert worden waren, betrug die Luciferaseaktivität nur ca. 10% der Aktivität der entsprechenden aktivierten Probe. Der Lysispuffer verursachte eine zu vernachlässigende Hintergrundlumineszenz.

Um zu testen, ob im Assay überhaupt eine Wirkung der NBD-Variante NBD5 gemessen werden konnte, wurden Peptide eingesetzt, in denen Wildtyp-NBD5 und eine nicht-funktionelle Mutante mit dem Membrandurchtritt verursachenden TAT-Peptid (Aminosäuren 47 – 57 des TAT-Proteins des Virus HIV1) fusioniert waren. Die NF-kappaB-inhibierende Wirkung solcher Peptide wurden bereits in einem inflammatorischen Maus-Modellsystem nachgewiesen (Dai *et al.*, 2004). Während für die nicht-funktionelle Mutante gegenüber der Pufferkontrolle gleich bleibend erhöhte Luciferaseaktivität gemessen wurde, wurde für das Peptid TAT-NBD5 mit der funktionellen NBD-Sequenz eine konzentrationsabhängige Reduktion der Luciferaseaktivität gemessen.

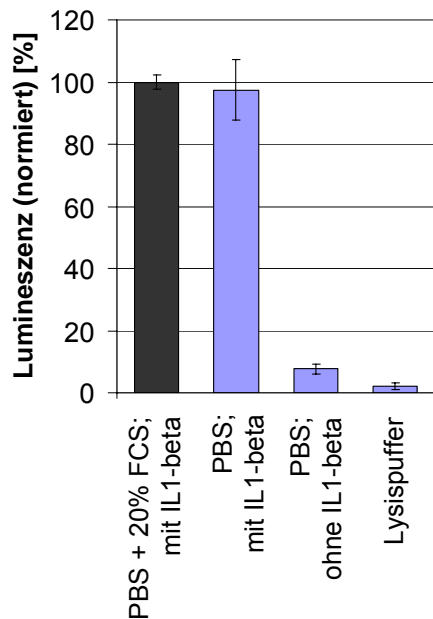
Es wurden zwei Konstruktvergleiche angestellt. Dabei wurde zum einen die Wirkung des Proteins LS5-SH83-A7 nur mit den Kontroll-Fusionsproteinen verglichen, die ebenfalls auf dem anti-CD71 scFv SH83-A7 beruhten. Beim zweiten Vergleich wurde das LS5-SH83-A7-Konstrukt mit dem auf dem anti-MUC1 scFv HT186-D11 basierenden LS5-Konstrukt und erneut mit dem SH83-A7 scFv verglichen. In beiden Vergleichen konnte keine signifikante Reduktion der Lumineszenz in den Proben des LS5-SH83-A7-Konstruktes detektiert werden, in den Ansätzen mit dem LS5-HT186-D11-Konstrukt wurde eine leicht erhöhte Lumineszenz gemessen. Die wirksame Reduktion der NF-kappaB-Aktivität durch die Präparation des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins LS5-SH83-A7 konnte in diesem Versuch demnach nicht nachgewiesen werden.



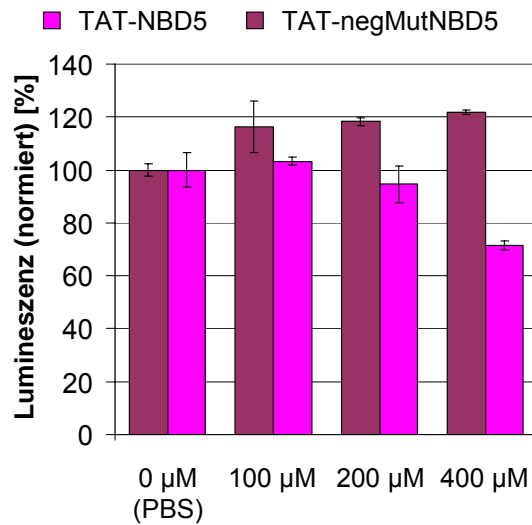
**Abb. 3.2-17: Durchflusszytometrische Analyse der LS-Konstrukte auf Basis der scFvs SH83-A7 und HT186-D11**

Pro Probe wurden 5000 Zählereignisse ausgewertet und das Ergebnis im Histogramm-Plot als Verteilungskurve der Fluoreszenzintensität dargestellt. Die grauen Verteilungskurven und der angegebene MFI-Wert gehören zu den im Kopf der Abbildung benannten Konstrukten. Als Negativkontrolle (schwarz umrandet, MFI-Wert im Kopf der Abbildung) diente das Nachweissystem ohne vorherige Inkubation der Zellen mit einem Konstrukt oder Antikörper. Nachweissystem für scFvs und LS-Konstrukte: Maus anti-His6 IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC. Nachweissystem für Maus anti-CD71 IgG: Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-FITC.

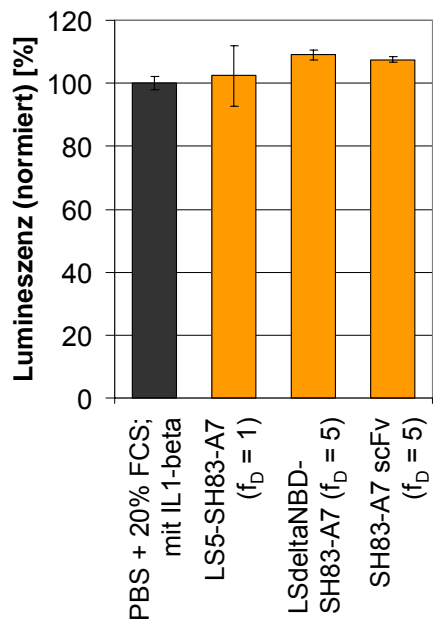
## A) Kontrollen



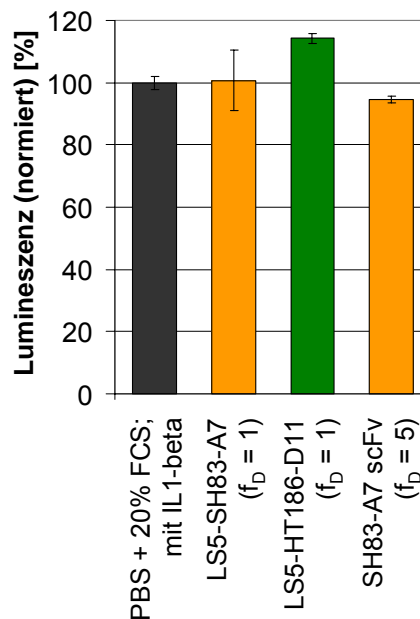
## B) Peptide



## C) Konstruktvergleich 1



## D) Konstruktvergleich 2



## Abb. 3.2-18: Ergebnisse des NF-kappaB-Reporterzellassays

In einer 96Well-Platte wurden je Vertiefung 7000 HEK293 Luc-Zellen ausgesät. In Triplikaten wurden die Zellen mit den produzierten und aufgereinigten LS-Proteinen (mit 20% FCS als Schutzprotein) inkubiert. Dabei wurden die Konzentrationen der Proteine SH83-A7 scFv und LSdeltaNBD-SH83-A7 durch Verdünnung in PBS + 20% FCS an die Konzentration des Konstruktes LS5-SH83-A7 angeglichen ( $f_b$ : Verdünnungsfaktor). Danach wurde der NF-kappaB-Signaltransduktionsweg durch Zugabe von Interleukin 1-beta aktiviert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Lysispuffers (Promega) lysiert und Proben der Lysate mit einem Luciferase-Substratreagens vermisch. In einem Detektor wurde die Lumineszenz gemessen. Als interner Standard, auf dessen Lumineszenz alle Proben normiert wurden, diente PBS (bei den Peptiden) bzw. PBS + 20% FCS (bei den Konstruktvergleichen). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

### 3.3 Rückfaltung bakterieller *Inclusion bodies*

Eine Möglichkeit, um nativ gefaltetes Zielprotein zu gewinnen, ist die starke Überexpression des Zielgens in *E. coli*, so dass das produzierte Protein im Zytoplasma des Bakteriums unlösliche Proteinkomplexe, sog. *Inclusion bodies*, bildet. Diese lassen sich nach einem Zellaufschluss isolieren und durch Lösung in Puffern mit chaotropen Salzen (8 M Harnstoff, 6 M Guanidinhydrochlorid) entfalten. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln lassen sich die kovalenten Bindungen der Disulfidbrücken auflösen, so dass letztendlich einzelne, entfaltete Polypeptidketten vorliegen. Durch Entzug des denaturierenden Agens (z. B. durch Verdünnung oder Dialyse) und durch Zugabe eines Redoxsystems lassen sich bei geeignet gewählten Parametern (wie Temperatur, Rückfaltungsdauer, Konzentration des rückzufaltenden Proteins, Art und Konzentration der Komponenten des gewählten Redoxsystems, Druck u. v. m.) bei geeigneten Proteinen hohe Ausbeuten an korrekt gefaltetem Zielprotein erzielen (Vallejo und Rinas, 2004).

Für die Produktion des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 wurde das korrespondierende Genfragment in einen pET21-Vektor kloniert und in *E. coli* BLR(DE3)-Zellen exprimiert. *Inclusion bodies* wurden isoliert, solubilisiert sowie reduziert und anschließend durch schnelle Verdünnung in einem großen Volumen an Rückfaltungspuffer rückgefaltet. Das nach Rückfaltung lösliche Protein wurde im ELISA auf seine Spezifität hin getestet.

#### 3.3.1 Klonierung des Vektors pET21 LS7-IQ111-2

Der Vektor pET21a(+) wurde mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Der für das Konstrukt LS7-IQ111-2 kodierende DNS-Abschnitt wurde durch eine PCR mit den Primern BVO 45 und BVO 46 auf Grundlage des Vektors pOPE101 LS7-IQ111-2 amplifiziert und nach Restriktion mit den gleichen Enzymen mit dem Gerüst des pET-Vektors ligiert. Positive Ligationsklone wurden durch Kolonie-PCR und Kontrollverdaue mit dem Enzym *XhoI* identifiziert. Die korrekte Sequenz wurde durch Sequenzierung mit den Primern BVO 45, BVO 46, BVO 31, CM 7, CM 8, CM 9, CM 10, CM 42, CM 43 und aTFR-VH/F1 verifiziert. Das Konstrukt wurde als pET21 LS7-IQ111-2 bezeichnet (Abb. 3.3-1).

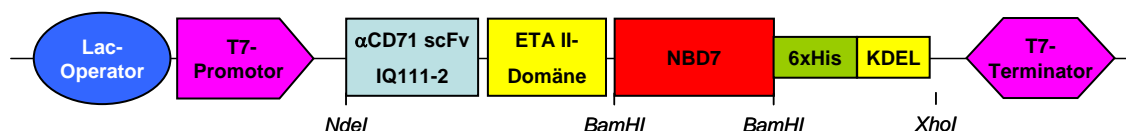
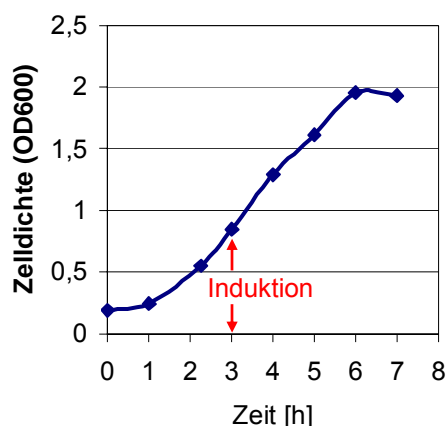


Abb. 3.3-1: Das Konstrukt LS7-IQ111-2 im Vektor pET21

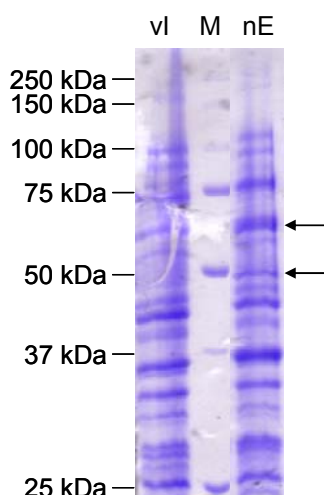
### 3.3.2 Produktion, Reinigung und Rückfaltung der bakteriellen *Inclusion bodies*

Kompetente *E. coli* BLR(DE3)-Zellen wurden mit dem Vektor pET21 LS7-IQ111-2 transformiert. Die Expression des Zielgenes wurde durch Zugabe von IPTG während der Wachstumsphase 3 h nach Inokulation indirekt induziert: Das IPTG induziert die Expression des Gens für die T7-RNA-Polymerase, welches im Lambda-DE3-Lysogen genomisch in den BLR(DE3)-Zellen vorliegt. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert dann das unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehende Genfragment des LS7-IQ111-2-Konstruktes. Die Zelldichte stieg bis zum Zeitpunkt von 3 h nach Induktion an, dann stagnierte sie, woraufhin die Kultur geerntet wurde (Abb. 3.3-2 A). Neben dem vollständigen Zielprotein bei 65 kDa wurde im Western Blot mit anschließender Immunfärbung und im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung ein Abbauprodukt bei knapp unter 50 kDa detektiert. Da sich der C-terminale 6xHis-Tag detektieren ließ, muss das Protein im Bereich des scFvs proteolytisch geschnitten worden sein. Im Western Blot wurden nach Immunfärbung noch weitere Abbauprodukte in geringeren Mengen detektiert (Abb. 3.3-2 B und C).

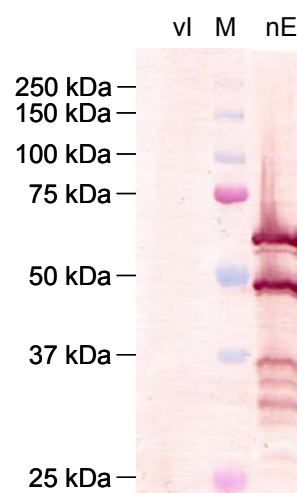
#### A) Wachstumskurve



#### B) Zelllysat (SDS-Gel)



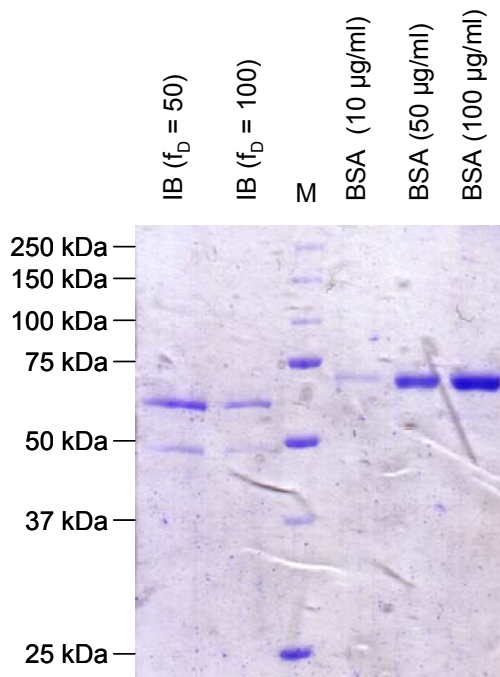
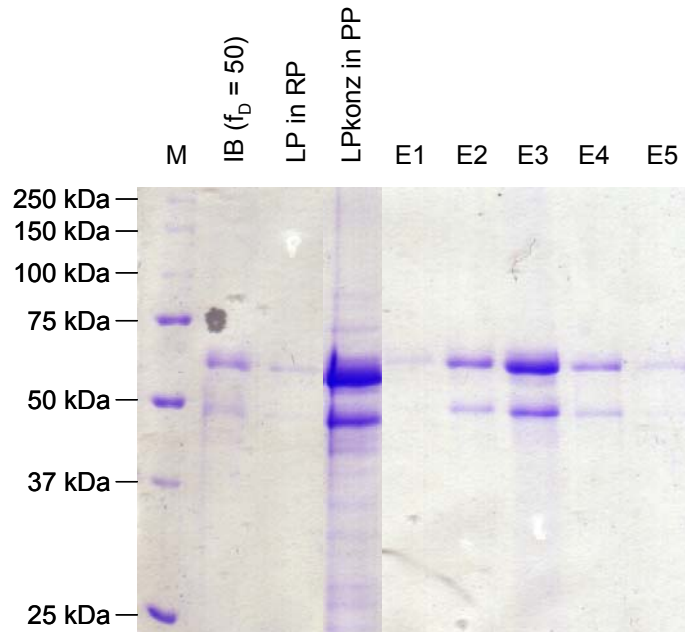
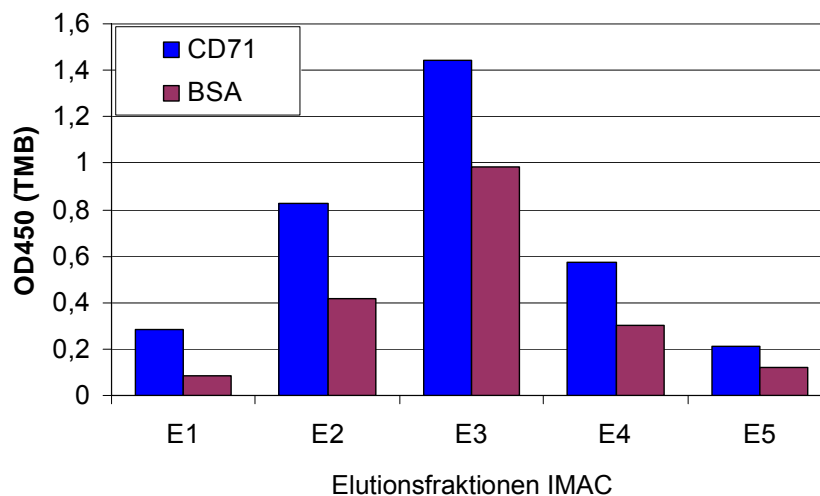
#### C) Zelllysat (Western Blot)



**Abb. 3.3-2: Produktion des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 in *E. coli* BLR(DE3)-Zellen**

**A) Wachstumskurve** der Produktionskultur. Die Zellen wurden bei 30 °C kultiviert und mit 1 mM IPTG induziert. **B) und C): SDS-Gel nach Coomassie-Färbung bzw. Western Blot** mit auf die Zelldichte (OD600) normierten Proben des Zelllysates vor der Induktion (vl) und nach der Ernte (nE). Pfeile markieren Banden des Zielproteins und eines Fragmentes. M: Größenstandard. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP.

Nach der Ernte wurden die Zellen aufgeschlossen und die *Inclusion bodies* präpariert. Die Solubilisierung erfolgte mit 6 M Guanidinhydrochlorid. Da das Salz in SDS-Probenpuffer sofort ausfiel, wurden die Proben der solubilisierten Proteine vor dem Versetzen mit SDS-Ladepuffer stets um den Faktor 50 oder 100 in PBS verdünnt. Die *Inclusion bodies* wurden reduziert, rückgefaltet, die Proteinlösung im Rückfaltungspuffer ankonzentriert, gegen Phosphatpuffer umgepuffert und das Zielprotein über den 6xHis-Tag aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden im Antigen-ELISA überprüft (Abb. 3.3-3).

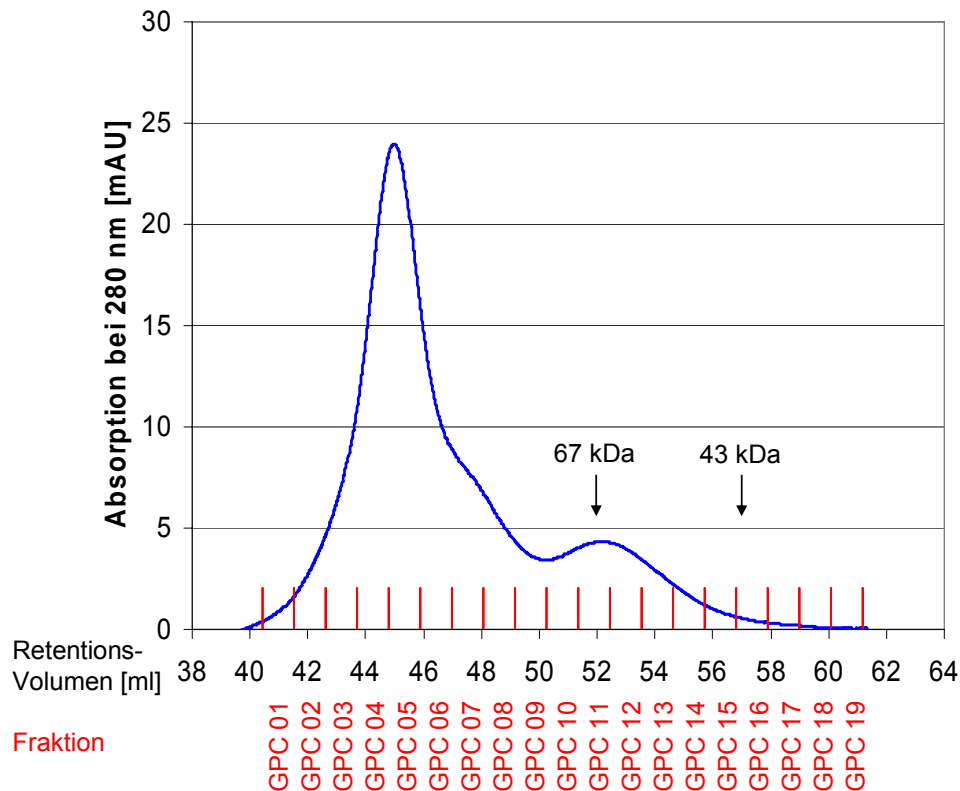
**A) Solubilisierte *Inclusion bodies*****B) Rückfaltung und Aufreinigung des Zielproteins****C) Spezifität des rückgefalteten und aufgereinigten Zielproteins im Antigen-ELISA**

**Abb. 3.3-3: Aufreinigung und Spezifität des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 aus *E. coli* BLR(DE3)-Zellen**

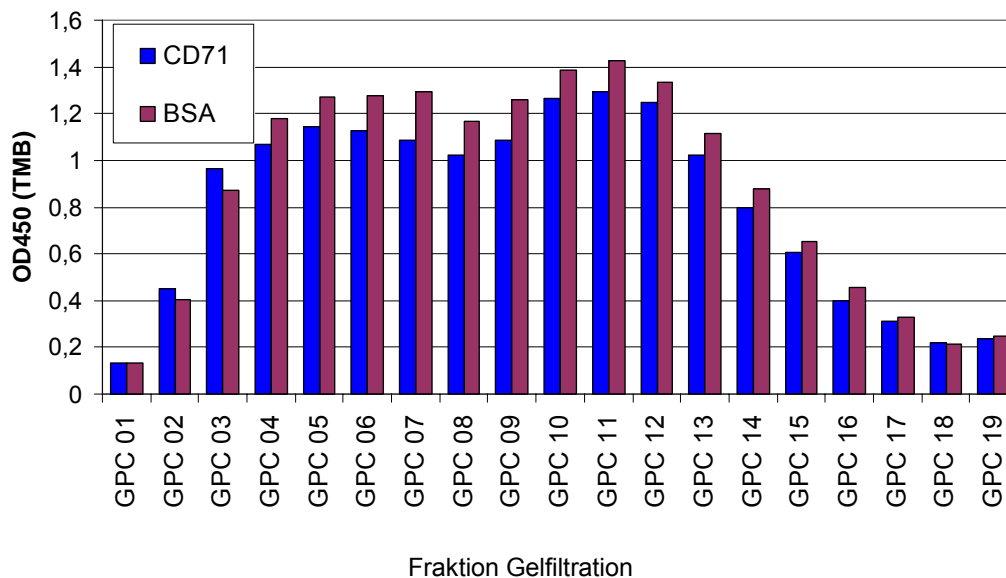
**A) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung** mit Proben der solubilisierten *Inclusion bodies*. Aus der Bandenstärke des vollständigen LS7-IQ111-2-Konstruktes wurde durch Vergleich mit den Banden des BSA eine Konzentration dieses Proteins von 2 mg/ml abgeschätzt. IB: *Inclusion bodies* in Solubilisierungspuffer.  $f_D$ : Verdünnungsfaktor. M: Größenstandard **B) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung** mit Proben aus der Rückfaltung und Aufreinigung des rückgefalteten Zielproteins. IB: *Inclusion bodies* in Solubilisierungspuffer.  $f_D$ : Verdünnungsfaktor. LP in RP: lösliches Protein in Rückfaltungspuffer. LPkonz in PP: lösliches Protein nach Aufkonzentrierung aus Rückfaltungspuffer und Umpufferung gegen Phosphatpuffer. E1 – E5: Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung des löslichen Proteins über den 6xHis-Tag. M: Größenstandard. **C) Antigen-ELISA** mit den Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung des löslichen, rückgefalteten Zielproteins. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.



### A) Chromatogramm Gelfiltration mit Probe E3 aus IMAC-Aufreinigung



### B) Antigen-ELISA mit Fraktionen der Gelfiltration



### Abb. 3.3-4: Spezifität des rückgefalteten Zielproteins nach Gelfiltration

**A) Chromatogramm** der Auftrennung der Elutionsfraktion E3 aus der IMAC-Aufreinigung von rückgefaltetem LS7-IQ111-2-Material. Als Laufpuffer diente PBS. Säule: Superdex75 HiLoad16/60. Mit Pfeilen bezeichnet sind die Retentionsvolumina von Kalibrierproteinen mit bekanntem Molekulargewicht. **B) Antigen-ELISA** mit den Fraktionen aus der Gelfiltration. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

In der Präparation der solubilisierten *Inclusion bodies* wurden im SDS-Gel neben dem vollständigen Zielprotein LS7-IQ111-2 auch das Abbauprodukt bei knapp 50 kDa detektiert, die schon im Zelllysat in Proben der Produktionskultur detektiert worden war (Abb. 3.3-3 A). Die *Inclusion bodies* enthalten also neben dem Zielprotein auch eine unvollständige Variante des Zielproteins.

Bei der Rückfaltung fiel Protein aus und wurde durch Filtration abgetrennt. In der aufkonzentrierten und umgepufferten Proteinlösung wurden die beiden Proteine detektiert, die schon zuvor bei den *Inclusion bodies* detektiert worden waren (Abb. 3.3-3 B). Die Proteine lagen löslich in hoher Konzentration vor (ca. 2 mg/ml). Bei der Aufreinigung über den 6xHis-Tag wurden das vollständige Zielprotein und das Abbauprodukt gemeinsam eluiert und lagen in den Elutionsfraktionen in hoher Reinheit vor (Abb. 3.3-3 B). Das Proteingemisch band im Antigen-ELISA allerdings nicht ausschließlich an CD71, sondern auch in den mit dem Kontrollantigen BSA beschichteten Vertiefungen (Abb. 3.3-3 C).

Eine Probe der am stärksten konzentrierten Elutionsfraktion (E3) aus der IMAC-Aufreinigung wurde mittels präparativer Gelfiltration weiter aufgereinigt (Abb. 3.3-4). Der Hauptteil der Proteinpräparation bestand aus Aggregaten, nur ein kleiner Teil wurde bei einem Retentionsvolumen um 52 ml eluiert, bei welchem erwartungsgemäß das vollständige LS7-IQ111-2-Fusionsprotein eluiert werden sollte. Die Elutionsfraktionen wurden für einen Antigen-ELISA eingesetzt. Es wurde in jeder Fraktion ein hohes OD450-Signal sowohl in den mit CD71 als auch in den mit dem Kontrollantigen BSA beschichteten Vertiefungen der ELISA-Platte gemessen, was auf unspezifische Bindung des produzierten Proteins hindeutet. Die Fraktionen wurden daher nicht weiter analysiert.

Aus der Produktion durch Rückfaltung von *Inclusion bodies* konnte unter den gewählten Bedingungen somit kein spezifisch bindendes Material gewonnen werden.

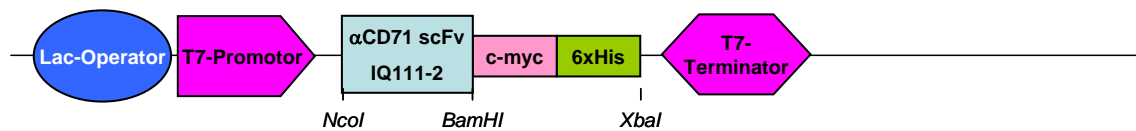
### **3.4 Produktion im Zytoplasma von *E. coli*-Stämmen mit oxidativem Milieu**

Sowohl das im *Ligand Sneaking*-Konstrukt enthaltene scFv-Antikörperfragment als auch die ETA II-Domäne enthalten Disulfidbrücken. Damit sich die entsprechenden kovalenten Bindungen ausbilden können, muss die Faltung unter oxidativen Bedingungen ablaufen. Der *E. coli*-Stamm Rosetta-gami(DE3) bietet diese Bedingungen in seinem Zytoplasma aufgrund von Mutationen in den Genen für die Thioredoxin- und die Glutathion-Reduktase. Zur Produktion wurden die Zielgene in pET21-Vektoren kloniert, in *E. coli* Rosetta-gami(DE3) exprimiert und das Zielprotein aus den aufgeschlossenen Zellen über IMAC aufgereinigt. Das Material wurde dann im Antigen-ELISA auf seine Spezifität hin untersucht.

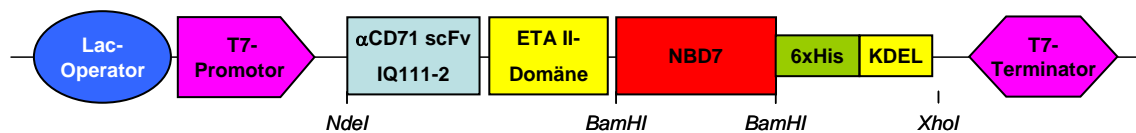
### 3.4.1 Klonierung der Konstrukte in den pET21-Vektor

Um eine Anpassung an die pOPE101-Vektoren zu erreichen, wurden die Restriktionsschnittstellen des Vektors pET21a(+) modifiziert. Dazu wurde der Vektor pET21 LS7-IQ111-2 mit den Enzymen *Xba*I und *B*l*p*I geschnitten und das Vektorgerüst für die Klonierung genutzt.

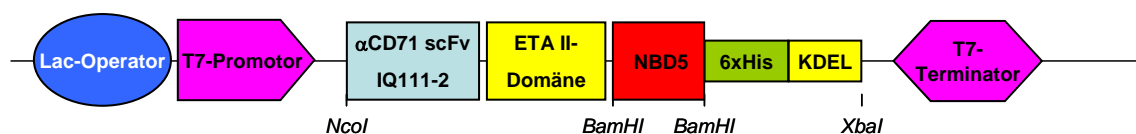
#### A) pET21 IQ111-2 scFv



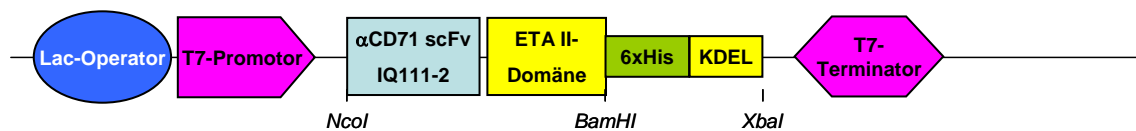
#### B) pET21 LS7-IQ111-2



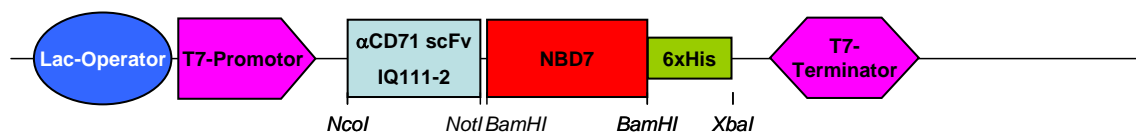
#### C) pET21 LS5-IQ111-2



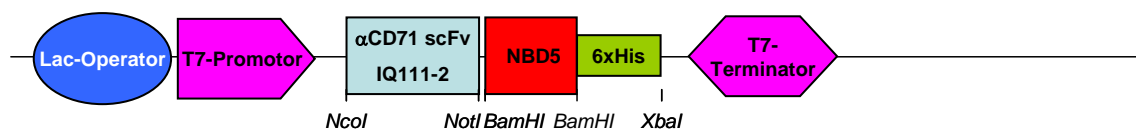
#### D) pET21 LSdeltaNBD-IQ111-2



#### E) pET21 IQ111-2-NBD7



#### F) pET21 IQ111-2-NBD5



#### Abb. 3.4-1: LS-Konstruktvarianten im Vektor pET21

Die Klonierung des Konstruktes pET21 LS7-IQ111-2 wurde in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Ein DNS-Fragment, das aus der partiellen Hybridisierung der Oligonukleotide BVO 53 und BVO 54 mit anschließender Vervollständigung zu doppelsträngiger DNS und Restriktion mit den Enzymen *N*heI

und *Bgl*II stammte, wurde mit dem Vektor ligiert. Der Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Nhe*I erzeugte miteinander kompatible komplementäre Einzelstrangüberhänge, die miteinander ligiert wurden. Dabei blieb in dem dadurch entstehenden Vektor (pET21 ExpressHis) weder eine *Xba*I- noch eine *Nhe*I-Schnittstelle zurück, da die entstehende Sequenz nicht mehr palindromisch ist. Das aus der Hybridisierung stammende DNS-Fragment enthält eine neue *Xba*I-Schnittstelle, die für die weitere Klonierung genutzt wurde.

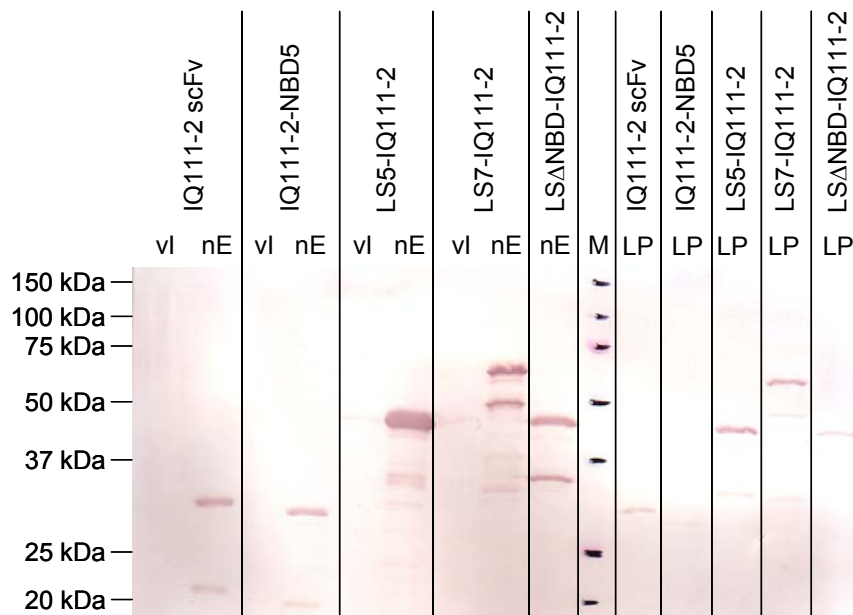
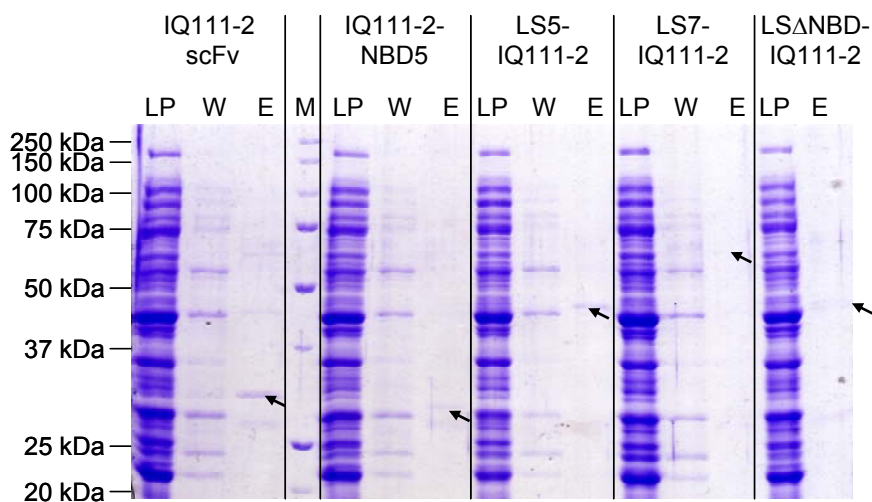
Aus den Vektoren pOPE101 LS5-IQ111-2, pOPE101 IQ111-2 scFv, pOPE101 IQ111-2-NBD7 und pOPE101 IQ111-2-NBD5 wurden über die Schnittstellen *Nco*I und *Xba*I die kodierenden Genfragmente herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pET21 ExpressHis kloniert. Die entstandenen Vektoren wurden als pET21 IQ111-2 scFv (Abb. 3.4-1 A), pET21 LS5-IQ111-2 (Abb. 3.4-1 C), pET21 IQ111-2-NBD7 (Abb. 3.4-1 E) bzw. pET21 IQ111-2-NBD5 (Abb. 3.4-1 F) benannt. Aus dem Vektor pET21 LS5-IQ111-2 wurde mit dem Enzym *Bam*HI der für die NBD-Variante NBD5 kodierende Sequenz herausgeschnitten und das Vektorgerüst religiert. Das dadurch entstandene Konstrukt wurde als pET21 LSdeltaNBD-IQ111-2 bezeichnet (Abb. 3.4-1 D).

Positive Ligationsklone wurden jeweils durch Kolonie-PCR mit den Primern CM 42 und CM 43 identifiziert. Zur Verifizierung der Sequenz wurden in den Sequenzierungsreaktionen die Primer CM 42, CM 43, CM 7, CM 8, CM 9, CM 10, BVO 55 und BVO 56 eingesetzt.

### 3.4.2 Produktion und Aufreinigung unterschiedlicher Varianten der LS-Fusionsproteine

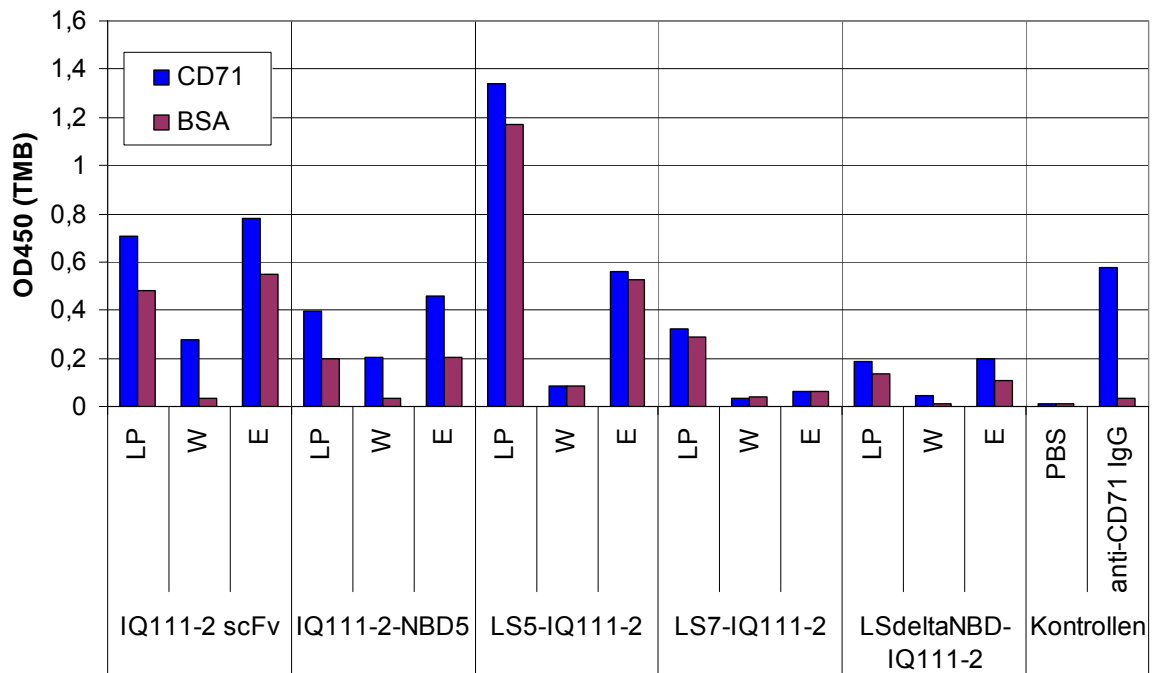
*E. coli* Rosetta-gami(DE3)-Zellen wurden mit den pET21-Konstrukten transformiert und Klone in Schüttelkolben kultiviert. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion mit IPTG mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und das jeweilige Zielprotein im *Batch*-Verfahren aus der löslichen Proteinfraction heraus aufgereinigt (Abb. 3.4-2).

Während die Proteine IQ111-2 scFv, IQ111-2-NBD5, LS7-IQ111-2 und LSdeltaNBD-IQ111-2 in vergleichbarer Menge im Zelllysate der Produktionskultur vorhanden waren, wurde das Protein LS5-IQ111-2 stärker produziert. Der Western Blot zeigt nach Immunfärbung neben den jeweiligen Banden für das vollständige Protein auch Banden für Abbauprodukte. Für das Konstrukt IQ111-2-NBD7 konnte nur degradiertes Material nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Banden des jeweiligen Zielproteins in der löslichen Proteinfraction sind sehr schwach für die Proteine IQ111-2 scFv, IQ111-2-NBD5 und LSdeltaNBD-IQ111-2, für die beiden Proteine LS5-IQ111-2 und LS7-IQ111-2 sind sie deutlich stärker (Abb. 3.4-2 A). Dies deutet darauf hin, dass die drei ersten Proteine nicht in löslicher Form produziert wurden, sondern mit der unlöslichen Fraktion verworfen wurden.

**A) Western Blot nach Immunfärbung mit Proben aus Zelllysatz und löslicher Proteinfraction****B) SDS-Gel nach Coomassiefärbung mit Proben aus der Aufreinigung****Abb. 3.4-2: Produktion von LS-Fusionsproteinen mit *E. coli* Rosetta-gami(DE3)**

**A) Western Blot nach Immunfärbung.** vl: Zelllysatz vor Induktion. nE: Zelllysatz nach Ernte. LP: lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss. M: Größenstandard. Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP. **B) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben aus der Aufreinigung.** LP: lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss. W: Waschfraktion (50 mM Imidazol). E: Elutionsfraktion (250 mM Imidazol). M: Größenstandard. Banden der Zielproteine (teils sehr schwach) wurden mit Pfeilen gekennzeichnet.

Nur von den Proteinen IQ111-2 scFv und LS5-IQ111-2 konnten im Coomassie-gefärbten SDS-Gel deutliche Mengen aufgereinigten Proteins nachgewiesen werden, die anderen Fusionsproteine ließen sich nicht so erfolgreich aufreinigen (Abb. 3.4-2 B). Proben aus der Aufreinigung wurden im Antigen-ELISA auf ihre Spezifität hin überprüft (Abb. 3.4-3).



**Abb. 3.4-3: Spezifität des Zielproteins aus der Produktion in *E.coli* Rosetta-gami(DE3)**

LP: lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss. W: Waschfraktion (50 mM Imidazol). E: Elutionsfraktion (250 mM Imidazol). Nachweissystem: Maus anti-PentaHis IgG + Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifisch)-HRP.

Für die Fusionsproteine IQ111-2-NBD5, LS7-IQ111-2 und LDdeltaNBD-IQ111-2 wurden aufgrund der geringen Konzentration des Zielproteins nur geringe Werte im ELISA gemessen. Für die Proteine IQ111-2 scFv und LS5-IQ111-2 wurde eine Bindung sowohl an das Zielantigen CD71 als auch an das Kontrollantigen BSA gemessen. Die Fusionsproteine lagen schon nach dem Zellaufschluss in der löslichen Proteinfraction als unspezifisch bindende Moleküle vor. Da der IQ111-2 scFv alleine und auch das auf ihm basierende Fusionsprotein diese Unspezifität zeigten, ist es wahrscheinlich, dass der scFv für sie verantwortlich ist. Die Methode eignet sich somit nicht für die Produktion von spezifisch bindenden *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen basierend auf dem anti-CD71 scFv IQ111-2.

## 4. Diskussion

### 4.1 Das *Ligand Sneaking*-Konzept

Das Konzept des *Ligand Sneaking* beruht auf dem spezifischen Einschleusen von Effektordomänen in Form von Antikörperfusionsproteinen in das Zytoplasma von Zellen, um Signaltransduktionswege zu modulieren. Auf diesem Wege ließe sich Zugang zu einer Vielzahl von therapeutisch interessanten Zielproteinen gewinnen. In dieser und einer vorangegangenen Arbeit (Broders, 2004) wurden *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteine entwickelt und untersucht, welche die Unterbrechung des NF-kappaB-Signalweges bewirken sollten. Eine Unterbrechung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB stellt aufgrund seiner Bedeutung für viele Formen von Krebs und in inflammatorischen Krankheiten (Karin *et al.*, 2002; Li und Verma, 2002; Lin und Karin, 2003) eine therapeutisch interessante Anwendung dar.

Es wurde zunächst das *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsprotein LS7-NBDsII entwickelt und die Reduktion der NF-kappaB-Aktivität in humanen Zellen untersucht (Broders, 2004). Das Fusionsprotein enthält den anti-CD71 scFv-Klon IQ111-2, der für die Bindung an den Transferrin-rezeptor 1 (CD71) auf der Oberfläche von humanen Zellen sorgt, mit dem zusammen das Protein internalisiert werden sollte. Aufgrund seiner schnellen und effizienten Internalisierung eignete sich der Transferrinrezeptor für die generelle Überprüfung der Funktionalität des Ligand Sneaking-Konzeptes (Aisen, 2004). Über eine *Linker*-Sequenz ist das scFv-Antikörperfragment mit der Translokationsdomäne ETA II aus dem *Pseudomonas* Exotoxin A verbunden, welche den Übertritt des C-terminalen Proteinfragmentes, das aus einer *NEMO binding domain* (NBD) besteht, in das Zytoplasma der Zielzelle vermitteln sollte (Ogata *et al.*, 1990). Mit der NBD-Domäne sollte die Bildung des IKK-Komplexes in der Zielzelle und damit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB über den kanonischen Signalweg verhindert werden (Strickland und Ghosh, 2006).

Das Protein LS7-NBDsII wurde sekretorisch in *Escherichia coli* produziert, wobei die Ausbeute aus periplasmatischen Extrakten sehr gering war und eine Aufreinigung über einen N-terminalen 6xHis-Tag nicht die gewünschte Reinheit erbrachte (Broders, 2004). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die sekretorische Produktion in den eukaryotischen Zellsystemen HEK293T bzw. *Pichia pastoris* untersucht, aber auch in diesen Systemen ließ sich das Zielprotein nicht in zufriedenstellender Menge herstellen (Dr. Thomas Jostock und Dr. Christian Menzel, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde daher eine Produktionsstrategie für *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine erarbeitet und untersucht, welche Faktoren für die Schwierigkeiten bei der Produktion verantwortlich waren.

*Ligand Sneaking*-Fusionsproteine müssen effizient und spezifisch durch die Zielzelle internalisiert werden, dann erfolgreich die Endosomenmembran überwinden, um schließlich eine funktionelle Effektordomäne in das Zytoplasma zu schleusen, wo diese schließlich effizient mit einer Komponente

des Signaltransduktionsweges interagieren muss, um das Signal zu modulieren. Der internalisierende Oberflächenrezeptor erfüllt in diesem Konzept eine wichtige Funktion. Seine Menge auf der Zelloberfläche und seine Internalisierungsrate bestimmen, wie viele Antikörperfusionsproteine mit einer bestimmten Rate in die Zelle aufgenommen werden können. Für eine maximale Aufnahmemenge und -rate ist daher eine hochaffine Wechselwirkung des LS-Fusionsproteins mit dem Rezeptor notwendig. Die Translokationsdomäne muss effektiv den Übertritt der Effektdomäne aus dem Endosom in das Zytoplasma katalysieren, damit im Zytoplasma die maximale Konzentration an Effektmolekülen erreicht wird. Ansonsten können Abbauprozesse durch lysosomale Proteine zur Degradation des *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteins führen. Wenn die Effektdomäne keine katalytische Funktion besitzt, sind zum einen die Zahl an Effektdomänen, die in funktionellem Zustand tatsächlich das Zytoplasma der Zielzelle erreichen, und zum anderen die Affinität, mit der die Effektdomäne an ihren Bindungspartner bindet, von erheblicher Bedeutung für die Unterbrechung des Signaltransduktionsweges. Je höher die Konzentration der Effektdomäne im Zytoplasma und die Affinität der Bindung sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung mit der Zielkomponente des Signaltransduktionsweges. Die Situation stellt sich als kompetitive Hemmung der natürlichen Interaktion dar, bei der die Konzentrationen von Effektdomäne, Bindungskomponente und dem natürlichen Bindungspartner sowie die entsprechenden Dissoziationskonstanten über den Erfolg der Unterbrechung des Signaltransduktionsweges entscheiden. Die gewählte Produktionsmethode für *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine muss eine hohe Ausbeute an reinem und funktionell gefaltetem Zielprotein sicherstellen, damit auf jeder Stufe des Wirkprozesses eine maximale Anzahl von Molekülen erfolgreich seine Funktion erfüllen kann. Wesentlich dabei ist bei Proteinen mit scFv- und ETA II-Anteil die korrekte Bildung der intramolekularen Disulfidbrücken.

## **4.2 Produktion von *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen durch Sekretion**

### **4.2.1 Produktion in eukaryotischen Expressionssystemen**

Die Produktion des ursprünglichen LS7-NBDsII-Proteins auf sekretorischem Wege in eukaryotischen Expressionssystemen wie HEK293T-Zellen, der Hefe *Pichia pastoris* und in Insektenzellen war nicht erfolgreich. In eukaryotischen Expressionssystemen könnten *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine mit der ETA II-Translokationsdomäne nur ohne die C-terminale ER-Retentionssequenz KDEL sekretorisch produziert werden. In eukaryotischen Zellen werden sekretierte Proteine in das Endoplasmatische Retikulum geschleust. Dort würden LS-Fusionsproteine durch Wechselwirkung mit KDEL-Rezeptoren an der Sekretion gehindert (Munro und Pelham, 1987). Da die Effizienz der Translokationsdomäne ETA II aber ohne KDEL-Sequenz massiv reduziert ist (Seetharam *et al.*, 1991), stellt dies einen deutlichen, negativen Einfluss der Produktionsmethode auf die Aktivität des Zielproteins dar. Die Aminosäuresequenz KDEL fungiert auch in Insektenzellen als ER-Retentionssignal (Goo *et al.*, 2002; Saville *et al.*, 2002). Die Infektion von Insektenzellen mit



Baculoviren hat keinen Einfluss auf die Funktionalität des Retentionssystems (Henderson *et al.*, 1996). Da Baculoviren aber Insektenzellen lysieren, könnte u. U. nach der Lyse vollständiges LS-Fusionsprotein auch mit KDEL-Sequenz aus dem Medienüberstand isoliert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht gezeigt werden. Da bei der Zelllyse auch Proteasen freigesetzt werden, die das produzierte Protein hydrolysieren können, müsste hier bei der Analyse des zeitlichen Verlaufes der Produktion der optimale Ernte-Zeitpunkt gesucht werden. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, dass das hier getestete LS-Protein für seine Funktionalität nicht auf posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen und Glykosylierungen angewiesen ist, stellt die Anwendung von komplexen eukaryotischen Expressionssystemen für die untersuchten LS-Fusionsproteine nicht die Methode der Wahl dar.

#### **4.2.2 Produktion in *Escherichia coli***

Das *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsprotein LS7-IQ111-2 wurde aus dem ursprünglichen Protein LS7-NBDsII entwickelt, indem die N-terminalen Tags durch einen C-terminalen 6xHis-Tag direkt vor dem ER-Retentionssignal KDEL ersetzt wurden. Dies erlaubt die Analyse des Verbleibs der Effektordomäne über immunologische Nachweismethoden. Das Fusionsprotein ließ sich auf sekretorischem Wege in *E. coli* nicht erfolgreich produzieren. Das Protein interagierte mit der Bakterienzellmembran bei der Sekretion über den Sec-Transportweg durch Verwendung eines PelB-Signalpeptids, wie die Isolation von bakteriellen Membranen zeigte. Verantwortlich für die Interaktion mit der Membran waren der anti-CD71 scFv-Klon IQ111-2 und die NBD-Variante NBD7. Dies zeigte sich durch Vergleiche mit anderen LS-Proteinen, bei denen NBD7 entweder deletiert oder gegen die kürzere Variante NBD5 ausgetauscht worden war und bei denen zusätzlich der scFv-Anteil durch die anti-CD71 scFv-Antikörperfragmente TOM A6 oder SH83-A7 ausgetauscht worden war. Vermutlich lassen sich die Produktionsprobleme des ursprünglichen LS-Fusionsproteins LS7-NBDsII ebenfalls auf diese Sequenzen zurückführen. Möglicherweise stellen sie ebenfalls die Ursache für die Produktionsprobleme auf sekretorischem Wege in eukaryotischen Expressionssystemen dar.

Es kann nur vermutet werden, warum der scFv-Klon IQ111-2 und die NBD-Variante NBD7 mit der Bakterienmembran interagieren. Integrale Membranproteine werden in *E. coli* normalerweise über den SRP-Transportweg zur Membran transportiert und verlassen das SecYEG-Translocon seitwärts in die Lipiddoppelschicht hinein, wobei bei vielen internen Membranproteinen das *E. coli*-Protein YidC eine wichtige Rolle spielt. Die Membranproteine interagieren mit der Membran normalerweise über hydrophobe Helices (Luirink *et al.*, 2005). Ob derartige Prozesse bei der Sekretion des LS7-IQ111-2-Proteins eine Rolle spielen, kann aus den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Zwar wurde zur Sekretion der SecYEG-Komplex angesteuert, dieses geschah jedoch aufgrund des PelB-Signalpeptids über den Sec-Transportweg. Auch weisen die beiden fraglichen Proteinteile keine herausragend hydrophoben Bereiche auf.

Mit der Methode der Sekretion in das Periplasma konnten auf den Antikörpern TOM A6 scFv und SH83-A7 scFv basierende LS-Proteine produziert und aufgereinigt werden, wenn die LS-Proteine

entweder kein NBD oder aber die kurze NBD-Variante NBD5 anstatt der Variante NBD7 enthielten. Es zeigte sich, dass in diesen Fusionsproteinen die Bindungs- und Produktionseigenschaften denen des jeweiligen scFv-Antikörperfragments allein glichen. Sowohl der Antikörper TOM A6 als auch das Fusionsprotein LS5-TOM A6 wurden gut sekretiert. Der Antikörper erwies sich aber als instabil, konzentrierte Elutionsfraktionen nach einer Aufreinigung über den 6xHis-Tag zeigten deutlich schwächere Bindung im ELISA als geringer konzentrierte Proben vor der Aufreinigung. Durchflusszytometrische Analysen zeigten außerdem, dass der Antikörper nicht an CD71 auf Zellen binden und daher keine Internalisierung des Fusionsproteins auslösen konnte. Der scFv-Klon SH83-A7 wurde besser als der Klon IQ111-2, aber schlechter als der Klon TOM A6 sekretiert. Daher war auch bei den Fusionsproteinen LS5-SH83-A7 und LSdeltaNBD-SH83-A7 die Ausbeute geringer als bei den TOM A6-basierten Proteinen. Die aufgereinigte Proteinpräparation zeigte eine schwache Bindung an den Transferrinrezeptor auf Zellen. Im Gegensatz zum scFv-Klon TOM A6 zeigte der Klon SH83-A7 auf immobilisiertem CD71 aber nur eine geringe Bindung im ELISA. Vermutlich erkennt der scFv-Klon SH83-A7 ein CD71-Epitop, das bei der Immobilisierung des Antigens auf ELISA-Platten partiell denaturiert wird, weshalb der scFv nur an einen Bruchteil des immobilisierten Antigens im ELISA binden kann. Dass sich dieser Klon bei der *Panning*-Prozedur im Phagendisplay, bei der ebenfalls immobilisiertes CD71-Protein eingesetzt wurde, durchsetzen konnte, könnte auf unterschiedliche Produktchargen des Antigens zurückzuführen sein.

Das LS-Antikörperfusionsprotein LS5-SH83-A7, welches in der Durchflusszytometrie schwach an CD71-positive Zellen gebunden hatte, zeigte im NF-kappaB-Reporterzellassay keine Reduktion der NF-kappaB-abhängigen Luciferaseaktivität. Mehrere Faktoren können für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Zum einen war die Konzentration des Proteins in der verwendeten Präparation im Vergleich zu den Präparationen von Kontrollproteinen gering. Da die Bindung an Zellen in der Durchflusszytometrie sehr schwach ausfiel, was auf eine geringe Affinität oder Aktivität des scFv-Antikörperfragmentes hindeutet, bedeutet dies, dass auch nur eine geringe Menge an Zielprotein überhaupt die Möglichkeit hatte, internalisiert zu werden. Die erfolgreiche Internalisierung ist allerdings die Voraussetzung für alle weiteren Schritte bis zur Inhibition der Bildung des IKK-Komplexes. Eine ähnliche Abhängigkeit konnte für Immuntoxine, die aus unterschiedlichen anti-CD3 scFvs und den Domänen ETA II und ETA III des *Pseudomonas* Exotoxins A bestanden, gezeigt werden: Es bestand eine positive Korrelation zwischen Affinität der scFvs und der Zytotoxizität der jeweiligen Immuntoxine (Hexham *et al.*, 2001). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden zudem CHO-TRVb-1-Zellen verwendet, die den humanen Transferrinrezeptor überexprimieren, während für den Reporterassay HEK293 Luc-Zellen verwendet wurden, bei denen die CD71-Menge auf der Oberfläche nicht künstlich erhöht ist. Es ist somit wahrscheinlich, dass im NF-kappaB-Reporterzellassay die Antigenmenge auf jeder Zelle geringer war als bei den Zellen in der Durchflusszytometrie.

Wenn bei der Translokation aus dem Endosom nur ein Bruchteil der internalisierten Moleküle in das Zytoplasma gelangt war, dann war die Konzentration an Effektormolekülen im Zytoplasma möglicherweise zu gering, um einen messbaren Effekt zu erzeugen. Hinzu kommt, dass in dem Assay das TAT-NBD-Peptid erst bei einer Konzentration von 400 µM eine deutlich messbare Reduktion der

NF-kappaB-Aktivität herbeiführen konnte, während in der Literatur Konzentrationen mit messbarem Effekt bei 100  $\mu$ M lagen (Choi *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2004). Demnach ist die Sensitivität des Assays problematisch. Einer Konzentration von 400  $\mu$ M LS-Fusionsprotein mit einer molekularen Masse von 50 kg/mol und gleicher Effizienz bei der Inhibition der NF-kappaB-Aktivierung wie das TAT-NBD-Peptid entspräche eine Massenkonzentration des Proteins von 20 mg/ml – die im Assay eingesetzte Konzentration lag um Größenordnungen darunter. Daher muss entweder der Assay optimiert oder aber eine andere Methode eingesetzt werden, um den Effekt von LS-Fusionsproteinen auf die NF-kappaB-Aktivität zu analysieren (wie z. B. EMSA (*electrophoretic mobility-shift assay*)-Analysen mit Kernextrakten von mit LS-Fusionsproteinen behandelten Zellen und kappaB-Box-Motiven enthaltenden DNS-Sonden oder die Analyse der Transkriptionsaktivität von NF-kappaB-regulierten Genen durch *RealTime*-PCR).

Die Qualität des verwendeten scFv-Antikörperfragments spielt eine große Rolle für das *Ligand Sneaking*-Konzept. Benötigt wird ein anti-CD71 scFv-Klon, der gut sekretierbar, spezifisch und stabil ist. In zwei unabhängigen Versuchen wurden mittels Phagendisplay unter Verwendung von immobilisiertem, aus humanen Plazentazellen aufgereinigtem Antigen Binder isoliert. Die Antikörperfragmente (TOM A6 scFv, SH83-A7 scFv) wurden den gestellten Anforderungen aber nicht gerecht. Um ein scFv-Antikörperfragment mit den gewünschten Eigenschaften zu isolieren, müssen die *Panning*-Bedingungen offenbar verändert werden. Mögliche Strategien wären z. B. die Veränderung der Quelle des Antigens, die Isolation durch *Panning* auf CD71-positiven CHO TRVb-1-Zellen mit Subtraktion auf CD71-negativen CHO TRVb-Zellen oder die Mutagenese von Gensequenzen der vorhandenen anti-CD71 scFv-Klone. Anschließend könnte nach stabileren, affineren Varianten des scFv-Klons TOM A6 gesucht werden, die ihre guten Sekretionseigenschaften nicht verloren haben. Auf der anderen Seite könnte eine Mutagenese des scFv-Klons IQ111-2 zu Varianten führen, welche unter Erhaltung der hohen Affinität des Antikörpers bessere Sekretionseigenschaften hätten (Nieba *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1998; Dona *et al.*, 2007).

Die LSdeltaNBD-Proteinvariante diene als Kontrolle, um zu analysieren, inwiefern eine durch ein LS-Fusionsprotein herbeigeführte Reduktion der NF-kappaB-Aktivität tatsächlich allein auf die Anwesenheit von NBD im Zytoplasma verursacht wurde. Eine weitere Kontrolle, in welcher der scFv-Anteil direkt mit der Effektdomäne NBD fusioniert war, diene zum Test der Funktion und der Bedeutung der Translokationsdomäne ETA II. Mit der NBD-Variante NBD7 ließ sich dieses Protein jedoch nicht sekretieren, und mit der kurzen NBD-Variante NBD5 wurde es während der Produktion abgebaut. Für die NBD5-Variante müsste die proteolytische Schnittstelle identifiziert und modifiziert werden, um eine stabile Proteinvariante zu erzeugen. Es wäre interessant, den unspezifisch in das Zytoplasma gelangenden Anteil an Effektdomänen mit diesem Kontrollprotein zu bestimmen.

Der Vergleich der LS-Proteine, die auf einem anti-CD71 scFv-Antikörperfragment basierten, mit LS-Proteinen mit einem scFv-Anteil, der an einen nicht bzw. mit geringer Effizienz internalisierenden Rezeptor an der Zelloberfläche gerichtet war, sollte zeigen, inwiefern unspezifische Aufnahme und Translokation in das Zytoplasma für eine Abnahme der NF-kappaB-Aktivität verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurden dafür LS-Proteine basierend auf dem anti-MUC1 scFv-Klon HT186-D11 getestet.

Wie beim Klon anti-CD71 scFv-Klon TOM A6 ließ sich das LS-Fusionsprotein mit der NBD-Variante NBD5 ähnlich gut sekretieren wie das Antikörperfragment allein. Dieser Kontroll-scFv ist eine affinitätsgeraffte Form des scFvs IIB6 (Tolékis, 2003). Antikörper, die an tumorassoziiertes MUC1 binden, können internalisiert werden (Henderikx *et al.*, 2002; Pericleous *et al.*, 2005; Danielczyk *et al.*, 2006). Das Antigen kommt jedoch auf den HEK293 Luc-Zellen, die für den NF-kappaB-Reporterzellassay verwendet werden, nicht vor. Obwohl die verwendete Präparation des LS5-HT186-D11-Fusionsproteins sehr schwach konzentriert war, zeigte sie eine starke Bindung an MUC1-positive MCF7-Zellen, was für eine hohe Affinität des scFvs spricht. Hier wäre eine Untersuchung von MUC1-positiven Zellen wie z. B. HeLa-Zellen (Yin *et al.*, 2003) mit stabil integriertem NF-kappaB-abhängigem Luciferase-Reporterkonstrukt interessant.

### **4.3 Produktion von *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen im Zytoplasma von *Escherichia coli***

#### **4.3.1 Rückfaltung bakterieller *Inclusion bodies***

Die aus bakteriellen *Inclusion bodies* isolierten Proteine liegen nach ihrer Solubilisierung in denaturierenden Puffern häufig in hoher Reinheit vor und sind gegen den Abbau durch Proteasen weitgehend unempfindlich. Durch geeignete Rückfaltungsansätze lassen sich funktionell gefaltete Proteine mit einer nativen Konfiguration der Disulfidbrücken herstellen. Bei zytoplasmatischer Produktion des Fusionsproteins LS7-IQ111-2 im *E. coli*-Stamm BLR(DE3) wurden große Mengen des Zielproteins produziert. Die Präparation der isolierten *Inclusion bodies* war schon vor einer chromatographischen Aufreinigung sehr rein. Ungefähr ein Drittel dieser Fraktion bestand aus einem ca. 12 kDa kleineren, im Western Blot mit anschließender Immunfärbung detektierbaren Abbauprodukt des Fusionsproteins, woraus sich ableiten lässt, dass die proteolytische Schnittstelle im IQ111-2 scFv-Antikörperfragment liegt. Schon während der Produktion wurde das Protein also im Zytoplasma gespalten und sowohl aus dem größeren Fragment als auch aus dem vollständigen Protein *Inclusion bodies* gebildet. Um nach der Rückfaltung nur das vollständige Zielprotein zu erhalten, wäre es notwendig, diese Schnittstelle zu identifizieren und durch Mutation eine stabile Variante des scFv-Antikörperfragmentes zu erstellen, bzw. durch Wechsel des *E. coli*-Produktionsstammes eine geringere Degradation zu bewirken.

Das rückgefaltete Protein erwies sich bei Analyse in der Gelfiltration als ein Gemisch von verschiedenen Aggregaten. Der Großteil bestand aus hochmolekularen Komplexen, während ein kleinerer Anteil beim für das monomere LS-Fusionsprotein erwarteten Retentionsvolumen eluiert wurde. Diese Fraktion enthielt jedoch neben dem vollständigen Zielprotein auch das um 12 kDa kleinere Fragment. Keine der gewonnenen Fraktionen zeigte eine spezifische Bindung an das Antigen CD71 im ELISA. Für Immuntoxine aus einem scFv-Antikörperfragment und den Domänen ETA II und ETA III des *Pseudomonas* Exotoxins A konnte gezeigt werden, dass die Faltung des scFv-Anteils limitierend für den Rückfaltungsprozess ist und dass die Primärstruktur der *Linker*-Sequenzen

zwischen scFv und ETA II maßgeblich die Faltungseffizienz beeinflusst (Brinkmann *et al.*, 1992). Ob im LS-Fusionsprotein ebenfalls der scFv-Anteil oder aber auch die NBD-Variante NBD7 für die nicht-native Faltung verantwortlich ist, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden.

Das Rückfaltungsprotokoll orientierte sich an Vorgaben aus der Rückfaltung von Immuntoxinen, welche aus einem scFv-Antikörperfragment und den Domänen ETA II und ETA III des *Pseudomonas* Exotoxins A bestanden (Chaudhary *et al.*, 1988; Batra *et al.*, 1990; Brinkmann *et al.*, 1992; Buchner *et al.*, 1992), und Empfehlungen aus methodischer Literatur. Bei der Rückfaltung der solubilisierten und reduzierten *Inclusion bodies* bilden sich entweder sofort Aggregate oder aber intermediäre Faltungszustände aus, welche sich in die gewünschte native oder eine unerwünschte nicht-native Form weiterfalten können. Zu den Faktoren, die einen Einfluss auf diese Faltung haben können, gehören u. a. die Temperatur, der Druck, der pH-Wert, die Proteinkonzentration und –reinheit, die Faltungsdauer, die Geschwindigkeit beim Entzug des denaturierenden Agens, die Anwesenheit von faltungsunterstützenden Substanzen oder Chaperonen und ein geeignetes Redoxsystem für die Bildung von Disulfidbrücken (Rudolph und Lilie, 1996; De Bernardez Clark *et al.*, 1999; Middelberg, 2002; Vallejo und Rinas, 2004). Die Optimierung dieser Faktoren müsste für jedes LS-Fusionsprotein individuell unter hohem Zeitaufwand durchgeführt werden. Trotzdem könnten damit *Ligand Sneaking*-Fusionsproteine produziert werden, die sich auf sekretorischem Wege nicht herstellen ließen. Besonders interessant wäre der Rückfaltungsansatz daher für LS-Fusionsproteine mit der NBD-Variante NBD7 oder anderen großen NBD-Varianten. Obwohl für die Wechselwirkung von IKK-2 und NEMO nur die sechs Aminosäuren der NBD-Region als notwendig erachtet werden (May *et al.*, 2002) und membrangängige Peptide mit nur geringen flankierenden Sequenzen die Bildung des IKK-Komplexes wirksam unterbinden (Choi *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2004; di Meglio *et al.*, 2005), ist es doch sehr wahrscheinlich, dass die Einbettung der NBD in eine möglichst native Struktur aus dem IKK-2-Protein die Wechselwirkung mit NEMO begünstigt und damit die Affinität steigert. Auf diese Weise könnte die Effektivität des LS-Fusionsproteins gesteigert werden.

#### **4.3.2 Produktion im Zytoplasma von *E. coli*-Stämmen mit oxidativem Zytoplasma-Milieu**

In *E. coli*-Stämmen, in deren Zytoplasma aufgrund der Mutationen in der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und der Glutathion-Reduktase (*gor*) ein oxidatives Milieu besteht, wurden scFv-Antikörperfragmente mit korrekt gebildeten Disulfidbrücken erfolgreich produziert (Jurado *et al.*, 2002). Durch die Fusion des scFv-Antikörperfragments mit dem Thioredoxin-Protein Trx1 wurde die Ausbeute an funktionellem scFv-Protein bei der Produktion in solchen Stämmen zusätzlich gesteigert (Jurado *et al.*, 2006).

Für die Produktion von *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta-gami(DE3), der die *trxB*- und *gor*-Mutationen trägt, verwendet. Für alle produzierten Proteine wurde jeweils nur eine geringe Menge an löslichem Protein erhalten, welches im Antigen-ELISA

unspezifische Bindung zeigte. Da das IQ111-2 scFv-Antikörperfragment, welches mit dieser Methode produziert wurde, im ELISA unspezifisch band, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses scFv-Antikörperfragment auch für die unspezifische Bindung der auf ihm basierenden LS-Fusionsproteine verantwortlich ist. Eine nicht-native Faltung der weiteren Proteindomänen kann aber nicht ausgeschlossen werden. Hier müsste durch Austausch des scFv-Antikörperfragmentes gegen andere anti-CD71 scFv-Klone die Auswirkung auf die Spezifität und die Ausbeute untersucht werden.

## 4.4 Ausblick

In dieser Arbeit zeigten alle getesteten Produktionsmethoden eine Abhängigkeit der Produzierbarkeit von der Aminosäuresequenz des zu produzierenden Proteins. Dies muss bei der weiteren Arbeit an der Verifikation des Konzeptes berücksichtigt werden. Die Wirksamkeit der einzelnen Domänen des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins – des scFvs, der ETA II-Domäne und der NBD-Effektordomäne – für sich genommen wurde in der Literatur, einer vorangegangenen Doktorarbeit (Broders, 2004) und auch dieser Arbeit belegt. Die Kombination dieser Einzelteile stellt jedoch eine komplexe Aufgabe dar, sei es bei der Identifikation von scFv-Antikörperfragmenten und NBD-Varianten, welche die Sekretion nicht behindern, sei es bei der Generierung von Proteinformen, die im Produktionsprozess stabil bleiben, oder bei der Etablierung von erfolgreichen Rückfaltungsprotokollen.

Für eine therapeutische Anwendung müssen LS-Fusionsproteine letztendlich im menschlichen Körper an ihre Zielzelle binden. Alle Anteile des Proteins müssen eine hohe Stabilität aufweisen, um bei Körpertemperatur im Milieu von Körperflüssigkeiten wie Blut sowie später im Endosom und auch im Zytoplasma einer Zelle ihre Aufgabe erfüllen zu können. Ein Antikörperfragment als Anteil, der an den internalisierenden Rezeptor an der Zelloberfläche bindet, ist für diese Aufgabe sehr gut geeignet, da mittels Phagendisplay die Generierung und Identifikation eines Binders mit den gewünschten Eigenschaften mit sehr gut etablierten Methoden möglich ist. Prinzipiell besteht aber auch die Möglichkeit, auf alternativen Proteingerüsten (Nygren und Skerra, 2004; Binz *et al.*, 2005) wie Lipocalinen („Anticaline“, Beste *et al.*, 1999), Fibronektinen (Koide *et al.*, 1998), Protein A („Affibodies“, Nord *et al.*, 1997) oder Ankyrin-Repeat Proteinen („DARPINS“, Binz *et al.*, 2004) beruhende Binder für diese Aufgabe einzusetzen.

Für die Etablierung des Konzeptes stellt der Transferrinrezeptor aufgrund seiner Internalisierungseigenschaften eine gute Wahl dar. Zwar gibt es Ansätze, die sich Transferrinrezeptor-vermittelte Endozytose für therapeutische Zwecke zu Nutze machen, z. B. zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (Qian *et al.*, 2002). Aufgrund seiner Anwesenheit auf der Oberfläche aller proliferierenden Zellen eignet er sich aber nicht als Ziel für spezifische Therapieansätze im Zusammenhang mit Krebserkrankungen oder inflammatorischen Erkrankungen. Für eine therapeutische Anwendung müssen andere internalisierende Rezeptoren identifiziert werden, welche die jeweilige Zelle als ein für die Therapie sinnvolles Ziel identifizieren. Um Nebenwirkungen zu vermeiden, sollte der Rezeptor also möglichst nur auf Zellen vorhanden sein, in denen die Unterbrechung eines Signalweges eine therapeutische Wirkung entfalten kann. Die Wechselwirkung des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins mit

dem Rezeptor muss hochspezifisch erfolgen, um Nebenwirkungen zu vermeiden. Zur Identifikation geeigneter Rezeptoren können u. a. Toxin-gekoppelte Antikörper (Klussman *et al.*, 2004) oder auch die Methodik des Phagendisplay verwendet werden (Poul *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004). Beispielsweise wäre eine Verwendung von anti-CD30 scFvs im Zusammenhang mit *Ligand Sneaking*-Fusionsproteinen interessant. CD30 wird an der Oberfläche von vielen Lymphom-Zellen überexprimiert, in denen eine erhöhte NF-kappaB-Aktivität gemessen wurde (Bargou *et al.*, 1996; Bargou *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2001). Ein gegen CD30 gerichtetes Immuntoxin (Matthey *et al.*, 2004) zeigte im Tiermodell und ein Antikörper-RNase-Fusionsprotein (Menzel *et al.*, 2008) *in vitro* Wirkung gegen bestimmte Lymphomzellen.

Das gezielte Einbringen von Effektormolekülen in das Innere von Zellen wird neben Ansätzen zur Konstruktion von Immuntoxinen auch mit unterschiedlichen anderen Ansätzen versucht. So wurden Proteine entwickelt, die DNS-Fragmente und Plasmide über rezeptorvermittelte Endozytose an spezifische Zielzellen liefern, wobei sowohl die Translokationsdomäne ETA II des *Pseudomonas* Exotoxins A (Fominaya und Wels, 1996; Fominaya *et al.*, 1998; Uherek und Wels, 2000; Erlwein *et al.*, 2002) als auch die Translokationsdomäne des Diphtherie-Toxins (Uherek *et al.*, 1998) verwendet wurden. Für die Aufnahme von siRNA-Molekülen in Zellen wurden RNS-Moleküle mit dem kationischen Peptid Protamin komplexiert, das seinerseits wiederum mit einem Zelloberflächenrezeptor-spezifischen scFv-Antikörperfragment fusioniert war (Li *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005; Liu, 2007; Peer *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2007). Daneben werden Antikörper-gekoppelte Liposomen für den spezifischen Transport unterschiedlicher Moleküle zu Zielzellen entwickelt (Pirollo *et al.*, 2006; Liu, 2007; Pirollo *et al.*, 2007; Sofou und Sgouros, 2008). Auch Virus-basierte Ansätze zur Gentherapie zielen auf die Beeinflussung intrazellulärer Vorgänge ab (Young *et al.*, 2006). Weiterhin werden zellmembrangängige Peptide als Transporter von therapeutischen Effektormolekülen auf ihre Wirksamkeit hin untersucht (Deshayes *et al.*, 2005; Fuchs *et al.*, 2005; Foerg und Merkle, 2008). Dabei wird auch versucht, die Funktion solcher Peptide mit Antikörper-vermittelter Zellspezifität zu verbinden (Bachran *et al.*, 2005; Bachran *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2007). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie wichtig eine spezifische Ansteuerung von Zielzellen und die Überwindung der Zellmembran als Barriere des Zellinnenraumes für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe ist. Das *Ligand Sneaking*-Konzept reiht sich mit seinem Ziel, intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse zu beeinflussen, in die Reihe dieser innovativen Ansätze ein.

Um die Effizienz der Konstrukte zu steigern, müssen Wege gesucht werden, um die Translokationseffizienz der ETA II-Domäne zu steigern. Dazu bietet es sich beispielsweise an, eine ETA II-Mutante im LS-Fusionsprotein zu verwenden, bei der ein kleiner helicaler Abschnitt deletiert wurde, wodurch die Effizienz der Translokation gesteigert werden konnte (Taupiac *et al.*, 1999). Alternativ könnten Domänen aus anderen Proteinen mit vergleichbarer Funktion getestet werden, wie z. B. die Translokationsdomäne des Diphtherie-Toxins (Collier, 2001). Die Verwendung des NBD-Peptids als Effektormolekül für die Unterbrechung des NF-kappaB-Signaltransduktionsweges hat sich in Form des TAT-NBD-Peptids bereits in einem *in vivo*-Modell als erfolgreiche Strategie zur Minderung von Entzündungssymptomen herausgestellt (Dai *et al.*, 2004). Über die Inhibition der Bildung des IKK-

Komplexes wird nur der kanonische, nicht aber der alternative Aktivierungsweg beeinflusst, und aufgrund der kompetitiven Natur der Inhibition wird der kanonische Aktivierungsweg zwar genügend gehemmt, um die Entzündungssymptome zu lindern, eine basale Aktivität bleibt aber erhalten. Damit ist die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen gering. Um die Wirkung der Effektormoleküle im Zytoplasma zu erhöhen, kann nach NBD-Varianten gesucht werden, die in strukturelle Elemente des nativen IKK-2-Proteins eingebettet sind, um die Affinität zum Protein NEMO zu erhöhen. Solange zum IKK-Komplex jedoch noch keine strukturellen Daten verfügbar sind, müssten empirisch oder mittels Peptid-Phagendisplay verschiedene lange Abschnitte des IKK-2-Proteins als NBD-Varianten getestet werden. Alternativ kann versucht werden, mit dem LS-Fusionsprotein mehrere kurze, mit einer geeigneten *Linker*-Sequenz verbundene NBD-Varianten in das Zytoplasma zu transportieren. Alle Veränderungen am LS-Fusionsprotein müssen dabei aber auf ihre Auswirkung auf die Produzierbarkeit des Proteins untersucht werden.

Eine grundsätzliche Herausforderung stellt die Immunogenität des artifiziellen *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteins dar. Bei mehrfacher Verabreichung in immunkompetenten Individuen ist eine Eliminierung des Fusionsproteins durch dessen Immunsystem sehr wahrscheinlich. So konnte z. B. für ein Immuntoxin, bestehend aus einem scFv-Antikörperfragment und den Domänen ETA II und ETA III des *Pseudomonas* Exotoxins A, schon nach zweimaliger Verabreichung eine Antikörperantwort des Immunsystems der Testpersonen festgestellt werden (Posey *et al.*, 2002). Der Antikörperanteil im LS-Fusionsprotein kann aus einem humanen Repertoire gewonnen bzw. humanisiert werden, wodurch seine Immunogenität positiv beeinflusst werden kann. Die Translokationsdomäne aus einem bakteriellen Toxin und die Effektordomäne, die im Falle der *NEMO binding domain* einen Teil eines intrazellulären Proteins darstellt, sowie die verbindenden *Linker*-Sequenzen sind vermutlich sehr immunogen. Für sie müssen eigene Lösungen entwickelt werden. Mögliche Ansätze wären hier die Verwendung von Immunsuppressiva während der Administration von LS-Fusionsproteinen, was aber zu vielen unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (Frankel, 2004). Eine weitere Möglichkeit bietet die Maskierung von Epitopen durch Polyethylenglykol (PEG)-Ketten, wodurch schon erfolgreich die Immunogenität von ETA-Immuntoxinen gesenkt werden konnte (Wang *et al.*, 1993; Tsutsumi *et al.*, 2000). Auch wurden durch die Veränderung der Aminosäuresequenz Epitope erfolgreich entfernt (Roscoe *et al.*, 1994). Parallel ließen sich andere Peptide auf ihre Eignung als Effektormolekül hin untersuchen, die einen Eingriff in andere therapeutisch relevante Signaltransduktionswege erlauben, wie den MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Weg, den PI3-Kinase-Weg oder die Jak-STAT-Aktivierung (Morel und Berenbaum, 2004). Der modulare Aufbau des *Ligand Sneaking*-Fusionsproteins lässt eine derartige Erweiterung des Spektrums seiner Anwendbarkeit prinzipiell zu.



## 5. Zusammenfassung / Summary

### 5.1 Zusammenfassung

*Ligand Sneaking*-Proteine sind Antikörperfusionsproteine, mit denen intrazelluläre Signaltransduktionswege moduliert werden sollen. Sie bestehen im Wesentlichen aus drei Komponenten. Der erste Teil dieser Fusionsproteine besteht aus einem scFv-Antikörperfragment, mit dem das Protein an einen internalisierenden Zelloberflächenrezeptor bindet. Der zweite Teil besteht aus einer Translokationsdomäne, welche die Translokation des dritten Teils, der Effektordomäne, aus dem Endosom in das Zytoplasma vermittelt. Die Effektordomäne interagiert im Zytoplasma mit Komponenten des Signaltransduktionsweges, um diesen zu modulieren.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde ein *Ligand Sneaking*-Fusionsprotein aus einem gegen den Transferrinrezeptor CD71 gerichteten scFv-Antikörperfragment, der Translokationsdomäne ETA II aus dem *Pseudomonas* Exotoxin A und einer *NEMO binding domain* (NBD) aus dem humanen I $\kappa$ B Kinase 2 (IKK-2)-Protein als Effektordomäne entwickelt. NBD bindet intrazellulär an NEMO (*NF-kappaB essential modulator*), die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, wodurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB durch proinflammatorische Stimuli unterbrochen wird. Eine gezielte Reduktion der NF-kappaB-Aktivität stellt bei vielen Krebserkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar.

Die Ausbeute bei der Produktion des *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteins durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli* war sehr gering. In dieser Arbeit wurden die Ursachen dafür untersucht und mehrere Produktionsmethoden auf ihre Eignung für die Produktion des Fusionsproteins überprüft. Es konnten grundlegende Voraussetzungen für die Produktion von *Ligand Sneaking*-Antikörperfusionsproteinen geklärt werden. Durch Rückfaltung des Fusionsproteins aus bakteriellen *Inclusion bodies* und durch Produktion in *E. coli*-Stämmen mit oxidativem Zytoplasma-Milieu konnte nur unspezifisch bindendes Zielprotein gewonnen werden. Auf sekretorischem Wege konnte die Ausbeute an Fusionsprotein in seiner ursprünglichen Form weder in *E. coli* noch in Insektenzellen erhöht werden. Es stellte sich heraus, dass sowohl der gewählte scFv-Klon als auch die verwendete NBD-Variante die Sekretion massiv behinderten. Neue anti-CD71 scFv-Antikörperfragmente wurden mittels Phagendisplay generiert und charakterisiert. Durch Austausch des scFv-Antikörperfragmentes und der NBD-Variante im LS-Fusionsprotein gegen andere Varianten ließen sich Fusionsproteine durch Sekretion ins Periplasma von *E. coli* erfolgreich produzieren und aufreinigen. Das Protein band spezifisch an Zielzellen. Eine Reduktion der NF-kappaB-Aktivität konnte über einen zellbasierten Reporterassay allerdings nicht nachgewiesen werden, wofür eine geringe Affinität des alternativen scFv-Klons und die mangelnde Sensitivität des Assaysystems verantwortlich waren.

## 5.2 Summary

The Ligand Sneaking concept aims at the manipulation of intracellular signal transduction pathways using antibody fusion proteins that consist of three parts. The first part is an scFv antibody fragment directed against an internalizing receptor on the surface of a target cell. The second part of the fusion protein is a translocation domain that is capable of translocating the third part of the fusion protein, an effector domain, from the endosome into the cytosol of the target cell. In the cytosol the effector domain interacts with components of the signal transduction pathway, thereby leading to the disruption or down-regulation of the signal transduction pathway.

In a previous work a Ligand Sneaking fusion protein was developed that consisted of an scFv antibody fragment directed against the transferrin receptor CD71, the translocation domain ETA II derived from the *Pseudomonas* Exotoxin A and the NEMO binding domain (NBD) derived from the human I $\kappa$ B kinase (IKK) 2 protein as the effector domain. The NBD effector domain binds to the intracellular protein NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) that represents the regulatory subunit of the IKK complex. Thus the formation of the native IKK complex is inhibited. Since formation and activation of the IKK complex represent the central events during the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by proinflammatory stimuli, NF- $\kappa$ B activity is decreased in the presence of free NBD. Increased cellular NF- $\kappa$ B activity has been identified in a number of inflammatory diseases and various forms of cancer. Therefore the targeted reduction of NF- $\kappa$ B-activity represents a promising therapeutic approach.

The yield of Ligand Sneaking fusion proteins produced by secretion into the periplasm of *E. coli* was very low. In this work the potential of several production methods to yield functional fusion protein was evaluated and basic requirements for the production of Ligand Sneaking fusion proteins were identified. Refolding from bacterial inclusion bodies and production in the cytosol of *E. coli* strains possessing an oxidative cytosol environment yielded unspecifically binding target protein. It was not possible to increase the yield of the original fusion protein from production by secretion neither in *E. coli* nor by using the insect cell production system. It was shown that the scFv antibody fragment and the NBD variant used in the original fusion protein were detrimental to secretion. New anti-CD71 scFv antibody fragments were isolated from phage display libraries and characterised. After exchange of both the scFv antibody fragment and the NBD variant originally used in the Ligand Sneaking fusion protein modified fusion proteins were successfully produced in *E. coli* and purified. The material specifically bound to target cells. However, using a cell based NF- $\kappa$ B activity reporter assay it was not possible to show a reduction of NF- $\kappa$ B-activity because of the low affinity of the alternative scFv antibody fragment and the low sensitivity of the assay system.

## 6. Literatur

- Adams, G. P., Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23, 1147-57.
- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2137-43.
- Alami, M., Taupiac, M. P., Reggio, H., Bienvenue, A., Beaumelle, B. (1998). Involvement of ATP-dependent Pseudomonas exotoxin translocation from a late recycling compartment in lymphocyte intoxication procedure. *Mol Biol Cell* 9, 387-402.
- Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5 ed.
- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1320-4.
- Amir, R. E., Haecker, H., Karin, M., Ciechanover, A. (2004). Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene* 23, 2540-7.
- Appleby, S. B., Ristimäki, A., Neilson, K., Narko, K., Hla, T. (1994). Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 ( Pt 3), 723-7.
- Arndt, M. A., Krauss, J., Vu, B. K., Newton, D. L., Rybak, S. M. (2005). A dimeric angiogenin immunofusion protein mediates selective toxicity toward CD22+ tumor cells. *J Immunother* 28, 245-51.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-90.
- Bachran, C., Heisler, I., Fuchs, H., Sutherland, M. (2005). Influence of protein transduction domains on target-specific chimeric proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 602-9.
- Bachran, C., Heisler, I., Bachran, D., Dassler, K., Melzig, M. F., Ervens, J., Fuchs, H. (2007). Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 7.
- Bagshawe, K. D., Sharma, S. K., Begent, R. H. (2004). Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1777-89.
- Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat Biotechnol* 22, 1399-408.
- Barbas, C. F., 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A., Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7978-82.
- Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., Royer, H. D., Scheidereit, C., Dorken, B. (1996). High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87, 4340-7.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., Dorken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-9.
- Batra, J. K., FitzGerald, D., Gately, M., Chaudhary, V. K., Pastan, I. (1990). Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells. *J Biol Chem* 265, 15198-202.

- Beg, A. A., Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-4.
- Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J* 17, 5170-81.
- Berks, B. C., Sargent, F., Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35, 260-74.
- Bertrand, F., Philippe, C., Antoine, P. J., Baud, L., Groyer, A., Capeau, J., Cherqui, G. (1995). Insulin activates nuclear factor kappa B in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway. *J Biol Chem* 270, 24435-41.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T., Skerra, A. (1999). Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1898-903.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G., Pluckthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22, 575-82.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Pluckthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-68.
- Blanco-Colio, L. M., Valderrama, M., Alvarez-Sala, L. A., Bustos, C., Ortego, M., Hernandez-Presa, M. A., Cancelas, P., Gomez-Gerique, J., Millan, J., Egido, J. (2000). Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 102, 1020-6.
- Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10701-5.
- Bond, M., Fabunmi, R. P., Baker, A. H., Newby, A. C. (1998). Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 435, 29-34.
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., Shulman, M. J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312, 643-6.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 147-53.
- Brinkmann, U., Buchner, J., Pastan, I. (1992). Independent domain folding of Pseudomonas exotoxin and single-chain immunotoxins: influence of interdomain connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3075-9.
- Broders, O. (2004), Dissertation: "Antikörper-Fusionsproteine zur Beeinflussung intrazellulärer Vorgänge", Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- Buchner, J., Pastan, I., Brinkmann, U. (1992). A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205, 263-70.
- Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P. A., Barde, Y. A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542-5.
- Chan, R. Y., Ponka, P., Schulman, H. M. (1992). Transferrin-receptor-independent but iron-dependent proliferation of variant Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 202, 326-36.
- Chaudhary, V. K., Mizukami, T., Fuerst, T. R., FitzGerald, D. J., Moss, B., Pastan, I., Berger, E. A. (1988). Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-Pseudomonas exotoxin hybrid protein. *Nature* 335, 369-72.
- Chaudhary, V. K., Jinno, Y., FitzGerald, D., Pastan, I. (1990a). Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 308-12.

- Chaudhary, V. K., Jinno, Y., Gallo, M. G., FitzGerald, D., Pastan, I. (1990b). Mutagenesis of *Pseudomonas* exotoxin in identification of sequences responsible for the animal toxicity. *J Biol Chem* 265, 16306-10.
- Chiron, M. F., Fryling, C. M., FitzGerald, D. J. (1994). Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* 269, 18167-76.
- Chiron, M. F., Fryling, C. M., FitzGerald, D. (1997). Furin-mediated cleavage of *Pseudomonas* exotoxin-derived chimeric toxins. *J Biol Chem* 272, 31707-11.
- Choi, J. H., Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 625-35.
- Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M. C., Scheidereit, C., Luft, F. C., Kettritz, R. (2003). Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 102, 2259-67.
- Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3, 958-65.
- Cogswell, P. C., Scheinman, R. I., Baldwin, A. S., Jr. (1993). Promoter of the human NF-kappa B p50/p105 gene. Regulation by NF-kappa B subunits and by c-REL. *J Immunol* 150, 2794-804.
- Collart, M. A., Baeuerle, P., Vassalli, P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10, 1498-506.
- Collier, R. J. (2001). Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39, 1793-803.
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H., Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J* 21, 5375-85.
- Cross, S. L., Halden, N. F., Lenardo, M. J., Leonard, W. J. (1989). Functionally distinct NF-kappa B binding sites in the immunoglobulin kappa and IL-2 receptor alpha chain genes. *Science* 244, 466-9.
- D'Acquisto, F., May, M. J., Ghosh, S. (2002). Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv* 2, 22-35.
- Dai, S., Hirayama, T., Abbas, S., Abu-Amer, Y. (2004). The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J Biol Chem* 279, 37219-22.
- Danielczyk, A., Stahn, R., Faulstich, D., Löffler, A., Marten, A., Karsten, U., Goletz, S. (2006). PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1337-47.
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., Staudt, L. M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194, 1861-74.
- De Bernardes Clark, E., Schwarz, E., Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* 309, 217-36.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-35.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-13.
- Derossi, D., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8, 84-7.

- Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G., Heitz, F. (2005). Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 62, 1839-49.
- Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-52.
- di Meglio, P., Ianaro, A., Ghosh, S. (2005). Amelioration of acute inflammation by systemic administration of a cell-permeable peptide inhibitor of NF-kappaB activation. *Arthritis Rheum* 52, 951-8.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-54.
- Dona, M. G., Giorgi, C., Accardi, L. (2007). Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer* 7, 25.
- Dübel, S. (2007). Recombinant therapeutic antibodies. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 723-9.
- Dübel, S., Allen, J., Antoni, C., Arends, R., Arndt, M. A. E., Bagshawe, K. D., Becker, H., Bergemann, K., Beyer, T. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 1 ed., Wiley-VCH.
- Eckmann, L., Jung, H. C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M. F. (1993). Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105, 1689-97.
- Erlwein, O., Wels, W., Schnierle, B. S. (2002). Chimeric ecotropic MLV envelope proteins that carry EGF receptor-specific ligands and the Pseudomonas exotoxin A translocation domain to target gene transfer to human cancer cells. *Virology* 302, 333-41.
- Ernst&Young (2007). Beyond Borders - Global Biotechnology Report 2007.
- Fekkes, P., Driessen, A. J. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 161-73.
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Andrews, N. C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1148-53.
- Foerg, C., Merkle, H. P. (2008). On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects. *J Pharm Sci* 97, 144-62.
- Fominaya, J., Wels, W. (1996). Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 271, 10560-8.
- Fominaya, J., Uherek, C., Wels, W. (1998). A chimeric fusion protein containing transforming growth factor-alpha mediates gene transfer via binding to the EGF receptor. *Gene Ther* 5, 521-30.
- Frankel, A. E. (2004). Reducing the immune response to immunotoxin. *Clin Cancer Res* 10, 13-5.
- Fuchs, H., Bachran, C., Heisler, I., Sutherland, M. (2005). A closer look at protein transduction domains as a tool in drug delivery. *Current Nanoscience* 1, 117-124.
- Fuchs, H., Bachran, C., Li, T., Heisler, I., Durkop, H., Sutherland, M. (2007). A cleavable molecular adapter reduces side effects and concomitantly enhances efficacy in tumor treatment by targeted toxins in mice. *J Control Release* 117, 342-50.
- Fujihara, S. M., Cleaveland, J. S., Grosmaire, L. S., Berry, K. K., Kennedy, K. A., Blake, J. J., Loy, J., Rankin, B. M., Ledbetter, J. A., Nadler, S. G. (2000). A D-amino acid peptide inhibitor of NF-kappa B nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease. *J Immunol* 165, 1004-12.
- Goo, T. W., Yun, E. Y., Hwang, J. S., Kang, S. W., Park, S., You, K. H., Kwon, O. Y. (2002). Molecular characterization of a Bombyx mori protein disulfide isomerase (bPDI). *Cell Stress Chaperones* 7, 118-25.
- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., et al. (1994). Antigen-specific human

- monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7, 13-21.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-99.
- Häcker, H., Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006, re13.
- Hanes, J., Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-42.
- Hannink, M., Temin, H. M. (1990). Structure and autoregulation of the c-rel promoter. *Oncogene* 5, 1843-50.
- Hayes, G. R., Enns, C. A., Lucas, J. J. (1992). Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology* 2, 355-9.
- Hazan, U., Thomas, D., Alcamí, J., Bachelier, F., Israel, N., Yssel, H., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. (1990). Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7861-5.
- Henderikx, P., Coolen-van Neer, N., Jacobs, A., van der Linden, E., Arends, J. W., Mullberg, J., Hoogenboom, H. R. (2002). A human immunoglobulin G1 antibody originating from an in vitro-selected Fab phage antibody binds avidly to tumor-associated MUC1 and is efficiently internalized. *Am J Pathol* 160, 1597-608.
- Henderson, J., Macdonald, H., Lazarus, C. M., Napier, R. M., Hawes, C. R. (1996). Protein retention in the endoplasmic reticulum of insect cells is not compromised by baculovirus infection. *Cell Biol Int* 20, 413-22.
- Hertlein, E., Wang, J., Ladner, K. J., Bakkar, N., Guttridge, D. C. (2005). RelA/p65 regulation of IkappaBbeta. *Mol Cell Biol* 25, 4956-68.
- Hexham, J. M., Dudas, D., Hugo, R., Thompson, J., King, V., Dowling, C., Neville, D. M., Jr., Digan, M. E., Lake, P. (2001). Influence of relative binding affinity on efficacy in a panel of anti-CD3 scFv immunotoxins. *Mol Immunol* 38, 397-408.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G., et al. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13, 6231-40.
- Holmes-McNary, M., Baldwin, A. S., Jr. (2000). Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 60, 3477-83.
- Hoogenboom, H. R., Raus, J. C., Volckaert, G. (1990). Cloning and expression of a chimeric antibody directed against the human transferrin receptor. *J Immunol* 144, 3211-7.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19, 4133-7.
- Hornig, T., Barton, G. M., Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835-41.
- Hoyos, B., Ballard, D. W., Bohnlein, E., Siekevitz, M., Greene, W. C. (1989). Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 244, 457-60.
- Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D., Fidler, I. J. (2000). Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 60, 5334-9.

- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-83.
- Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S., Pastan, I. (1987). Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* 48, 129-36.
- Jackson, M. E., Simpson, J. C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L. M., Lord, J. M. (1999). The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 112 ( Pt 4), 467-75.
- Jamieson, C., McCaffrey, P. G., Rao, A., Sen, R. (1991). Physiologic activation of T cells via the T cell receptor induces NF-kappa B. *J Immunol* 147, 416-20.
- Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005) *Immunobiology - the immune system in health and disease*, 6 ed.
- Jiang, J. X., London, E. (1990). Involvement of denaturation-like changes in *Pseudomonas* exotoxin a hydrophobicity and membrane penetration determined by characterization of pH and thermal transitions. Roles of two distinct conformationally altered states. *J Biol Chem* 265, 8636-41.
- Jing, S. Q., Trowbridge, I. S. (1987). Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *Embo J* 6, 327-31.
- Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., Sartor, R. B. (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* 163, 3474-83.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-5.
- Jostock, T., Dübel, S. (2005). Screening of molecular repertoires by microbial surface display. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 127-33.
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V., Fernandez, L. A. (2002). Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 320, 1-10.
- Jurado, P., de Lorenzo, V., Fernandez, L. A. (2006). Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*: evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin. *J Mol Biol* 357, 49-61.
- Kadokura, H., Katzen, F., Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72, 111-35.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-63.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-10.
- Kato, T., Jr., Delhase, M., Hoffmann, A., Karin, M. (2003). CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell* 12, 829-39.
- Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., Grewal, I. S., Cochran, A. G., Gordon, N. C., Yin, J., Starovasnik, M. A., Dixit, V. M. (2002). BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 17, 515-24.
- Klussman, K., Mixan, B. J., Cervený, C. G., Meyer, D. L., Senter, P. D., Wahl, A. F. (2004). Secondary mAb-vcMMAE conjugates are highly sensitive reporters of antibody internalization via the lysosome pathway. *Bioconjug Chem* 15, 765-73.



- Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., Strieter, R. M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-801.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X., Koide, S. (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141-51.
- Kolenko, V., Bloom, T., Rayman, P., Bukowski, R., Hsi, E., Finke, J. (1999). Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. *J Immunol* 163, 590-8.
- Kontermann, R. E., Liu, Z., Schulze, R. A., Sommer, K. A., Queitsch, I., Dubel, S., Kipriyanov, S. M., Breitling, F., Bautz, E. K. (1995). Characterization of the epitope recognized by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of Drosophila RNA polymerase II. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 473-81.
- Kontermann, R. E. (2005). Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* 26, 1-9.
- Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E., Tanabe, T. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221, 889-97.
- Koulich, E., Nguyen, T., Johnson, K., Giardina, C., D'Mello, S. (2001). NF-kappaB is involved in the survival of cerebellar granule neurons: association of IkappaBbeta [correction of Ikappabeta] phosphorylation with cell survival. *J Neurochem* 76, 1188-98.
- Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K., Saelinger, C. B. (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267, 12420-3.
- Krauss, J., Arndt, M. A., Vu, B. K., Newton, D. L., Rybak, S. M. (2005a). Targeting malignant B-cell lymphoma with a humanized anti-CD22 scFv-angiogenin immunoenzyme. *Br J Haematol* 128, 602-9.
- Krauss, J., Arndt, M. A., Vu, B. K., Newton, D. L., Seeber, S., Rybak, S. M. (2005b). Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 595-602.
- Kreitman, R. J., Pastan, I. (1995). Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J* 307 ( Pt 1), 29-37.
- Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen, N. J., Aggarwal, B. B. (1998). Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol* 55, 775-83.
- Kunsch, C., Rosen, C. A. (1993). NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 13, 6137-46.
- Kuprash, D. V., Udalova, I. A., Turetskaya, R. L., Rice, N. R., Nedospasov, S. A. (1995). Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene* 11, 97-106.
- Kurokawa, Y., Yanagi, H., Yura, T. (2001). Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in Escherichia coli. *J Biol Chem* 276, 14393-9.
- Lacy, D. B., Stevens, R. C. (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 291, 1091-104.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Larrick, J. W., Cresswell, P. (1979). Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. *J Supramol Struct* 11, 579-86.
- Li, Q., Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725-34.
- Li, X., Stuckert, P., Bosch, I., Marks, J. D., Marasco, W. A. (2001). Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 8, 555-65.
- Lin, A., Karin, M. (2003). NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 13, 107-14.
- Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R., Hawiger, J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 270, 14255-8.
- Liptay, S., Schmid, R. M., Nabel, E. G., Nabel, G. J. (1994). Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Mol Cell Biol* 14, 7695-703.
- Liu, B., Conrad, F., Cooperberg, M. R., Kirpotin, D. B., Marks, J. D. (2004). Mapping tumor epitope space by direct selection of single-chain Fv antibody libraries on prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 704-10.
- Liu, B. (2007). Exploring cell type-specific internalizing antibodies for targeted delivery of siRNA. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 112-9.
- Lo, C. J., Cryer, H. G., Fu, M., Lo, F. R. (1998). Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor kappaB. *J Trauma* 45, 19-23; discussion 23-4.
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstine, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C. C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G., et al. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-9.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W., Murphy, W. J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9730-4.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., de Gier, J. W. (2005). Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol* 59, 329-55.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. (1991). Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-97.
- Matthey, B., Borchmann, P., Schnell, R., Tawadros, S., Lange, H., Huhn, M., Klimka, A., Tur, M. K., Barth, S., Engert, A., Hansen, H. P. (2004). Metalloproteinase inhibition augments antitumor efficacy of the anti-CD30 immunotoxin Ki-3(scFv)-ETA' against human lymphomas in vivo. *Int J Cancer* 111, 568-74.
- May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 289, 1550-4.
- May, M. J., Marienfeld, R. B., Ghosh, S. (2002). Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. *J Biol Chem* 277, 45992-6000.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-4.
- McClelland, A., Kuhn, L. C., Ruddle, F. H. (1984). The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* 39, 267-74.

- McGraw, T. E., Greenfield, L., Maxfield, F. R. (1987). Functional expression of the human transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous transferrin receptor. *J Cell Biol* 105, 207-14.
- McKee, M. L., FitzGerald, D. J. (1999). Reduction of furin-nicked *Pseudomonas* exotoxin A: an unfolding story. *Biochemistry* 38, 16507-13.
- Menzel, C., Schirrmann, T., Konthur, Z., Jostock, T., Dübel, S. (2008). Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood* 111, 3830-7.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-6.
- Mere, J., Morlon-Guyot, J., Bonhoure, A., Chiche, L., Beaumelle, B. (2005). Acid-triggered membrane insertion of *Pseudomonas* exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *J Biol Chem* 280, 21194-201.
- Messens, J., Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1050-62.
- Middelberg, A. P. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437-43.
- Moorthy, A. K., Savinova, O. V., Ho, J. Q., Wang, V. Y., Vu, D., Ghosh, G. (2006). The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *Embo J* 25, 1945-56.
- Morel, J., Berenbaum, F. (2004). Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 71, 503-10.
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851-5.
- Muller, J. R., Siebenlist, U. (2003). Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem* 278, 12006-12.
- Munro, S., Pelham, H. R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Newton, D. L., Rybak, S. M. (2001). Preparation and preclinical characterization of RNase-based immunofusion proteins. *Methods Mol Biol* 160, 387-406.
- Newton, R., Kuitert, L. M., Bergmann, M., Adcock, I. M., Barnes, P. J. (1997). Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 28-32.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., Pluckthun, A. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* 10, 435-44.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M., Nygren, P. A. (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* 15, 772-7.
- Nygren, P. A., Skerra, A. (2004). Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 290, 3-28.
- Ogata, M., Chaudhary, V. K., Pastan, I., FitzGerald, D. J. (1990). Processing of *Pseudomonas* exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J Biol Chem* 265, 20678-85.
- Ogata, M., Fryling, C. M., Pastan, I., FitzGerald, D. J. (1992). Cell-mediated cleavage of *Pseudomonas* exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *J Biol Chem* 267, 25396-401.

- Olashaw, N. E., Kowalik, T. F., Huang, E. S., Pledger, W. J. (1992). Induction of NF-kappa B-like activity by platelet-derived growth factor in mouse fibroblasts. *Mol Biol Cell* 3, 1131-9.
- Omary, M. B., Trowbridge, I. S. (1981). Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J Biol Chem* 256, 12888-92.
- Palombella, V. J., Conner, E. M., Fuseler, J. W., Destree, A., Davis, J. M., Laroux, F. S., Wolf, R. E., Huang, J., Brand, S., Elliott, P. J., Lazarus, D., McCormack, T., Parent, L., Stein, R., Adams, J., Grisham, M. B. (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15671-6.
- Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y., Lin, J. K. (2000). Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem Pharmacol* 60, 1665-76.
- Parker, M. W., Pattus, F. (1993). Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci* 18, 391-5.
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J., Kreitman, R. J. (2007). Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med* 58, 221-37.
- Peer, D., Zhu, P., Carman, C. V., Lieberman, J., Shimaoka, M. (2007). Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4095-100.
- Pericleous, L. M., Richards, J., Epenetos, A. A., Courtenay-Luck, N., Deonarain, M. P. (2005). Characterisation and internalisation of recombinant humanised HMFG-1 antibodies against MUC1. *Br J Cancer* 93, 1257-66.
- Pirollo, K. F., Zon, G., Rait, A., Zhou, Q., Yu, W., Hogrefe, R., Chang, E. H. (2006). Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery. *Hum Gene Ther* 17, 117-24.
- Pirollo, K. F., Rait, A., Zhou, Q., Hwang, S. H., Dagata, J. A., Zon, G., Hogrefe, R. I., Palchik, G., Chang, E. H. (2007). Materializing the potential of small interfering RNA via a tumor-targeting nanodelivery system. *Cancer Res* 67, 2938-43.
- Posey, J. A., Khazaeli, M. B., Bookman, M. A., Nowrouzi, A., Grizzle, W. E., Thornton, J., Carey, D. E., Lorenz, J. M., Sing, A. P., Siegall, C. B., LoBuglio, A. F., Saleh, M. N. (2002). A phase I trial of the single-chain immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 8, 3092-9.
- Poul, M. A., Becerril, B., Nielsen, U. B., Morisson, P., Marks, J. D. (2000). Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol* 301, 1149-61.
- Qian, Z. M., Li, H., Sun, H., Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54, 561-87.
- Rasper, D. M., Merrill, A. R. (1994). Evidence for the modulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced pore formation by membrane surface charge density. *Biochemistry* 33, 12981-9.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter, G. (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-7.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., Dubel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 19, 75-78.
- Roscoe, D. M., Jung, S. H., Benhar, I., Pai, L., Lee, B. K., Pastan, I. (1994). Primate antibody response to immunotoxin: serological and computer-aided analysis of epitopes on a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin. *Infect Immun* 62, 5055-65.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- Ruben, S. M., Dillon, P. J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C. H., Maher, M., Baeuerle, P. A., Rosen, C. A. (1991). Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science* 251, 1490-3.

- Rudolph, R., Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* 10, 49-56.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 12, 674-84.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Saville, G. P., Thomas, C. J., Possee, R. D., King, L. A. (2002). Partial redistribution of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *J Gen Virol* 83, 685-94.
- Sblattero, D., Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18, 75-80.
- Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., Baldwin, A. S., Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-6.
- Scheuren, N., Bang, H., Munster, T., Brune, K., Pahl, A. (1998). Modulation of transcription factor NF-kappaB by enantiomers of the nonsteroidal drug ibuprofen. *Br J Pharmacol* 123, 645-52.
- Schindler, U., Baichwal, V. R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14, 5820-31.
- Schmitz, M. L., Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J* 10, 3805-17.
- Schmitz, M. L., Mattioli, I., Buss, H., Kracht, M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5, 1348-58.
- Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D., Williams, J. G. (1984). Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* 311, 675-8.
- Schrama, D., Reisfeld, R. A., Becker, J. C. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 147-59.
- Schreck, R., Baeuerle, P. A. (1990). NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* 10, 1281-6.
- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17, 221-37.
- Schubert, L. A., Cron, R. Q., Cleary, A. M., Brunner, M., Song, A., Lu, L. S., Jullien, P., Krensky, A. M., Lewis, D. B. (2002). A T cell-specific enhancer of the human CD40 ligand gene. *J Biol Chem* 277, 7386-95.
- Seetharam, S., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D., Pastan, I. (1991). Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. *J Biol Chem* 266, 17376-81.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-9.
- Shirakawa, F., Chedid, M., Suttles, J., Pollok, B. A., Mizel, S. B. (1989). Interleukin 1 and cyclic AMP induce kappa immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF-kappa B-like DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 9, 959-64.
- Sofou, S., Sgouros, G. (2008). Antibody-targeted liposomes in cancer therapy and imaging. *Expert Opin Drug Deliv* 5, 189-204.
- Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D., Paya, C. V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 277, 1405-18.

- Song, E., Zhu, P., Lee, S. K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D. M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D. B., Shankar, P., Marasco, W. A., Lieberman, J. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23, 709-17.
- Strickland, I., Ghosh, S. (2006). Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3, iii75-82.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-5.
- Surh, Y. J., Han, S. S., Keum, Y. S., Seo, H. J., Lee, S. S. (2000). Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF-kappaB and AP-1. *Biofactors* 12, 107-12.
- Tan, P. H., Chu, V., Stray, J. E., Hamlin, D. K., Pettit, D., Wilbur, D. S., Vessella, R. L., Stayton, P. S. (1998). Engineering the isoelectric point of a renal cell carcinoma targeting antibody greatly enhances scFv solubility. *Immunotechnology* 4, 107-14.
- Taupiac, M. P., Alami, M., Beaumelle, B. (1996). Translocation of full-length Pseudomonas exotoxin from endosomes is driven by ATP hydrolysis but requires prior exposure to acidic pH. *J Biol Chem* 271, 26170-3.
- Taupiac, M. P., Bebie, M., Alami, M., Beaumelle, B. (1999). A deletion within the translocation domain of Pseudomonas exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly. *Mol Microbiol* 31, 1385-93.
- Ten, R. M., Paya, C. V., Israel, N., Le Bail, O., Mattei, M. G., Virelizier, J. L., Kourilsky, P., Israel, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. *Embo J* 11, 195-203.
- Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80, 573-82.
- Toleikis, L. (2003), Dissertation: "Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1", Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- Trede, N. S., Tsytsykova, A. V., Chatila, T., Goldfeld, A. E., Geha, R. S. (1995). Transcriptional activation of the human TNF-alpha promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF-kappa B. *J Immunol* 155, 902-8.
- Trowbridge, I. S., Omary, M. B. (1981). Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3039-43.
- Tsutsumi, Y., Onda, M., Nagata, S., Lee, B., Kreitman, R. J., Pastan, I. (2000). Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8548-53.
- Uherek, C., Fominaya, J., Wels, W. (1998). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 273, 8835-41.
- Uherek, C., Wels, W. (2000). DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 44, 153-66.
- Vallejo, L. F., Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 3, 11.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-9.
- van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-24.
- Vieira, J., Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153, 3-11.

- Voll, R., Hantschel, M. (2001). NF-kappaB - Regulator im Immunsystem. *TargetForum* 2/2001, 34-44.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Baldwin, A. S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-7.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-3.
- Wang, C. Y., Cusack, J. C., Jr., Liu, R., Baldwin, A. S., Jr. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5, 412-7.
- Wang, Q. C., Pai, L. H., Debinski, W., FitzGerald, D. J., Pastan, I. (1993). Polyethylene glycol-modified chimeric toxin composed of transforming growth factor alpha and Pseudomonas exotoxin. *Cancer Res* 53, 4588-94.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Strobel, M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Weber, P. C. (1994). Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 14, 1665-73.
- Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J., McKay, D. B. (2001). Refined crystallographic structure of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *J Mol Biol* 314, 823-37.
- Wen, W. H., Liu, J. Y., Qin, W. J., Zhao, J., Wang, T., Jia, L. T., Meng, Y. L., Gao, H., Xue, C. F., Jin, B. Q., Yao, L. B., Chen, S. Y., Yang, A. G. (2007). Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology* 46, 84-94.
- Wertheimer, S. J., Myers, C. L., Wallace, R. W., Parks, T. P. (1992). Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 267, 12030-5.
- Wickner, W., Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452-6.
- Wright, J., Hillsamer, V. L., Gore-Langton, R. E., Cheson, B. D. (2000). Clinical trials referral resource. Current clinical trials for the proteasome inhibitor PS-341. *Oncology (Williston Park)* 14, 1589-90, 1593-4, 1597.
- Wu, M. X., Ao, Z., Prasad, K. V., Wu, R., Schlossman, S. F. (1998). IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 281, 998-1001.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-9.
- Xie, Q. W., Whisnant, R., Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177, 1779-84.
- Yamamoto, Y., Yin, M. J., Lin, K. M., Gaynor, R. B. (1999). Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 274, 27307-14.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107, 135-42.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-40.
- Yin, L., Li, Y., Ren, J., Kuwahara, H., Kufe, D. (2003). Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* 278, 35458-64.

- Yin, M. J., Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77-80.
- Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D., Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208, 299-318.
- Zhang, G., Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107, 13-9.